

Studio della molecola PEG su nanostrutture a
base argento mediante risonanza plasmonica
superficiale

Alessandro Zanuoli

Matricola: 1041181

Relatore: Ch.mo Prof. Alessandro Paccagnella

Co-relatore: Dr. Mauro Perino

Università degli Studi di Padova

Facoltà di Ingegneria

Laurea Magistrale in Bioingegneria

14 Aprile 2014

L'attività di ricerca svolta nella presenti Tesi è stata parzialmente supportata dal progetto intitolato:

Sviluppo di un sensore "label-free" capace di controllare la stabilità microbiologica dei vini imbottigliati in tempo reale

Finanziato dalla **Regione Veneto** sul bando
**124 - Azione S - COOPERAZIONE PER LO SVILUPPO
DI NUOVI PRODOTTI,
PROCESSI E TECNOLOGIE NEL SETTORE AGRICOLO,
ALIMENTARE E FORESTALE.**

*Ci si salva e si va avanti se si agisce insieme
e non solo uno per uno*
E.B.

Ai miei genitori e a mia nonna

Indice

1	Introduzione	11
2	Plasmoni di superficie	13
2.1	equazioni di Maxwell	13
2.1.1	Applicazione ai plasmoni di superficie	18
2.2	Plasmoni di superficie in singola interfaccia	21
2.3	La funzione dielettrica dei metalli	23
2.4	Estensione spaziale e lunghezza di propagazione dei plasmoni di superficie	26
2.5	Eccitazione dei plasmoni di superficie	27
2.5.1	Accoppiamento con prisma	28
2.5.2	Accoppiamento con grating	30
3	Biosensori basati su Risonanza Plasmonica (SPR)	33
3.1	Sensori SPR	33
3.1.1	Biosensori SPR per affinità	35
3.2	Funzionalizzazione	36
3.2.1	Self Assembled Monolayers	38
3.2.2	Tecniche di immobilizzazione	42
3.3	Performance principali dei sensori SPR	45
3.4	Sicurezza alimentare	49
4	Simulazione	53
4.1	Modello vettoriale	53
4.2	Rigorous Coupled Wave Analysis (RCWA)	55
4.2.1	Riflessione e trasmissione in sistemi multistrato	56
4.2.2	RCWA per dispositivi grating multilivello	60
4.2.3	Risultati della simulazione	66
4.3	Variazione indice rifrazione	69
5	Materiali e Metodi	73
5.1	Set-up del banco	74
5.1.1	Componenti del banco	74
5.1.2	Caratterizzazione dispositivi	77

5.2	Protocolli	78
5.2.1	Protocollo di pulizia dei dispositivi	78
5.2.2	Protocollo di funzionalizzazione con PEG 3400 Da	79
5.2.3	Immobilizzazione dell'anticorpo	82
6	Risultati Sperimentali	85
6.1	Ripetibilità del banco e dispositivi	85
6.1.1	Studio della sensibilità del banco	85
6.1.2	Caratterizzazione dei dispositivi non funzionalizzati	89
6.2	Funzionalizzazione con PEG	91
6.2.1	Prove a concentrazione costante	91
6.2.2	Prove al variare della concentrazione	94
6.3	Studio dell'immobilizzazione dell'anticorpo	96
6.3.1	Calcolo della sensibilità dell'indice di rifrazione	98
7	Conclusioni	101

Capitolo 1

Introduzione

La versatilità dei sensori basati sul fenomeno di risonanza plasmonica (SPR), detto anche accoppiamento plasmonico, ha portato ad un loro ampio utilizzo nell'ambito biologico e successivi sviluppi nel settore della sicurezza agroalimentare. Alcune delle caratteristiche principali di questa tipologia di sensori rispecchiano proprio le esigenze di un settore come quello della sicurezza agroalimentare che si pone come obiettivo quello di analizzare i processi di trasformazione dei prodotti in maniera efficiente ma soprattutto rapida.

I Polaritoni Plasmonici di Superficie (SPP) o plasmoni di superficie sono un particolare tipo di eccitazioni elettromagnetiche che si sviluppano e propagano lungo l'interfaccia tra un metallo e un mezzo dielettrico. Essi originano dall'accoppiamento tra gli elettroni liberi superficiali e le onde elettromagnetiche interagenti. Alla base di questo fenomeno ci sono le leggi di Maxwell che definiscono l'interazione tra onde elettromagnetiche e i metalli.

L'accoppiamento dei plasmoni di superficie con la componente parallela alla superficie del fascio luminoso incidente può avvenire solamente utilizzando un prisma ad elevato indice di rifrazione nelle configurazioni Kretschmann o Otto, oppure utilizzando superfici con nanostrutture periodiche (*reticolo di diffrazione*).

Inoltre, il verificarsi della condizione di accoppiamento plasmonico dipende strettamente dalle caratteristiche della superficie attiva del sensore stesso, in particolare dall'indice di rifrazione del mezzo dielettrico che si interfaccia alla superficie metallica. Una variazione dell'indice di rifrazione del mezzo dielettrico causa quindi una variazione della condizione di risonanza plasmonica.

Questa sensibilità dei sensori SPR potrà quindi essere sfruttata per rilevare, ad esempio, la presenza delle molecole adsorbite alla superficie.

L'idea di biosensore sviluppata consiste in una modifica a tre step della superficie del sensore: *strato di passivazione, immobilizzazione degli anticorpi e cattura dei batteri specifici* presenti nel campione. Ognuno di questi step provocherà una variazione dell'indice quantificabile.

In questa Tesi si svilupperanno i primi due step di modifiche della superficie attiva. Questa verrà quindi funzionalizzata, in maniera il più possibile omogenea attraverso un Self Assembled Monolayer (SAM) composto dalla molecola di Glicole Polietilenico (PEG). Questo strato di molecole consentirà di immobilizzare in maniera selettiva gli anticorpi policlonali di ratto anti-*Escherichia coli*.

Capitolo 1: Partendo dalle equazioni di Maxwell sarà definita la propagazione delle onde elettromagnetiche nei metalli nel caso generale, successivamente verrà applicata la formulazione al caso specifico dei plasmoni di superficie in singola interfaccia metallo/dielettrico. Verranno approfondite le tecniche di Kretschmann e quella con reticolo di diffrazione per l'eccitazione plasmonica.

Capitolo 2: Introduzione ai biosensori plasmonici per affinità e descrizione delle principali tecniche di riconoscimento utilizzate in letteratura. Descrizione delle tecniche di copertura della superficie attiva del sensore. Applicazione dei biosensori SPR nell'ambito della sicurezza alimentare e disposizioni legislative.

Capitolo 3: Simulazione del fenomeno di risonanza plasmonica applicato a dispositivi con reticolo di diffrazione, attraverso il modello basato sulla conservazione del vettore d'onda e attraverso Rigorous Coupled Wave Analysis (RCWA). Quantificazione della sensibilità nella rilevazione delle variazioni dell'indice di rifrazione.

Capitolo 4: Descrizione del banco di misura e dei dispositivi utilizzati, preparazione e modifica dell'area attiva del sensore: protocollo di pulizia, protocollo di funzionalizzazione con PEG 3400 Da e di immobilizzazione degli anticorpi policlonali di ratto anti-*Escherichia coli*.

Capitolo 5: Analisi della ripetibilità del banco di misura e dei dispositivi. Prove di funzionalizzazione a concentrazione costante e concentrazione variabile e immobilizzazione degli anticorpi policlonali di ratto anti-*Escherichia coli*. Calcolo della sensibilità del sistema alla variazione dell'indice di rifrazione dovuto ai trattamenti superficiali.

Capitolo 2

Plasmoni di superficie

I plasmoni di superficie (detti anche polaritoni plasmonici di superficie), sono delle particolari eccitazioni collettive degli elettroni che si propagano nella direzione perpendicolare all'interfaccia tra un layer dielettrico ed un conduttore. Queste onde elettromagnetiche superficiali si generano dall'accoppiamento tra i campi elettromagnetici e le oscillazioni degli elettroni presenti nel plasma del conduttore. Andremo prima ad analizzare l'effetto generale delle onde elettromagnetiche nei metalli, poi partendo dall'equazione d'onda andremo a descrivere le caratteristiche dei plasmoni di superficie, nel caso di interfacce metallo-dielettrico. Andremo inoltre a trattare le eccitazioni superficiali in termini di dispersione e profilo spaziale e andremo ad analizzare approfonditamente il confinamento dei campi elettromagnetici.

2.1 Equazioni di Maxwell e propagazione delle onde elettromagnetiche nei metalli

L'interazione tra metalli e campi elettromagnetici può essere descritta dalle leggi classiche basate sulle equazioni di Maxwell [1]. Se i mezzi metallici che analizziamo hanno delle nanostrutture uniformi con dimensioni dell'ordine di pochi nanometri possono essere descritte senza l'utilizzo dei principi della meccanica quantistica. E' noto dall'esperienza di tutti i giorni che per frequenze superiori alla banda percepita dall'occhio umano i metalli risultano essere altamente riflettenti e non permettono alle onde elettromagnetiche di propagarsi al loro interno. I metalli vengono tradizionalmente utilizzati per rivestire (placcare) guide d'onda e risonatori per radiazioni elettromagnetiche a microonde e frequenze lontane dagli infrarossi. Il comportamento dei metalli varia a seconda della frequenza del campo elettromagnetico in cui sono immersi:

- A *bassa frequenza* possiamo assumere l'oro come un conduttore ideale, con conducibilità infinita o finita ma comunque molto elevata. Questa

assunzione è valida per la maggior parte dei nostri scopi, dal momento che solo una frazione trascurabile dell'onda elettromagnetica incidente penetra nel metallo.

- A frequenze vicine all'*infrarosso* e alla parte visibile dello spettro, la penetrazione del campo aumenta notevolmente, con conseguente aumento della dissipazione. Abbiamo quindi che dispositivi che funzionano correttamente alle basse frequenze potrebbero non funzionare correttamente in un range di frequenze più elevato.
- Alla frequenza degli *ultravioletti*, i metalli si comportano come un dielettrico e permettono la propagazione delle onde elettromagnetiche al loro interno, con diversi gradi di attenuazione a seconda della struttura elettronica a bande. *Metalli alcalini* come il sodio hanno una risposta quasi priva di elettroni liberi e quindi mostrano una trasparenza ultravioletta. Per i *metalli nobili* come oro o argento invece, le transizioni tra bande elettroniche portano ad un forte assorbimento in questo regime.

Le proprietà dispersive dei metalli possono essere descritte mediante una costante dielettrica complessa $\varepsilon(\omega)$, questa fornisce la base di tutti i fenomeni che andremo a trattare. La fisica di base che sta dietro alla forte dipendenza della risposta ottica dalla frequenza è dovuta al cambio di fase, rispetto al campo guida, della corrente indotta in corrispondenza di frequenze che si avvicinano al reciproco del tempo di rilassamento caratteristico dell'elettrone τ . Prima di presentare una descrizione elementare delle proprietà ottiche dei metalli ricordiamo le equazioni di base che governano la risposta elettromagnetica, ossia le equazioni di Maxwell. Il vantaggio di questo approccio fenomenologico è che i dettagli delle interazioni fondamentali tra le particelle cariche all'interno dei mezzi e dei campi elettromagnetici possono essere trascurati; dal momento che i campi macroscopici, rapidamente variabili, sono mediati su distanze molto più grandi rispetto alla microstruttura sottostante [2]. Prendiamo quindi come punto di partenza le equazioni di Maxwell

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho_{ext} \quad (2.1a)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (2.1b)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad (2.1c)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J}_{ext} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} \quad (2.1d)$$

Queste equazioni collegano i quattro campi macroscopici: \mathbf{D} (*spostamento dielettrico*), \mathbf{E} (*campo elettrico*) e \mathbf{B} (*induzione magnetica o densità di flusso magnetico*) con la carica esterna ρ_{ext} e la densità di corrente \mathbf{J}_{ext} . All'interno della densità di corrente \mathbf{J}_{tot} e della carica ρ_{tot} includeremo i contributi dovuti alle cariche libere e alle cariche legate. Vengono distinti

invece i contributi della carica e densità esterna ρ_{ext} \mathbf{J}_{ext} e interna ρ_0 e \mathbf{J} , in modo che $\rho_{tot} = \rho_{ext} + \rho_0$ e $\mathbf{J}_{tot} = \mathbf{J}_{ext} + \mathbf{J}$. Abbiamo dunque che i contributi esterni azionano il sistema mentre quelli interni rispondono agli stimoli esterni [3]. I quattro campi macroscopici sono ulteriormente collegati mediante i vettori polarizzazione \mathbf{P} e magnetizzazione \mathbf{M}

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad (2.2a)$$

$$\mathbf{H} = \frac{1}{\mu_0} \mathbf{B} - \mathbf{M} \quad (2.2b)$$

Dove ε_0 e μ_0 sono rispettivamente la permittività elettrica ¹ e la permeabilità magnetica ² del vuoto. Nel nostro campo di applicazione non è necessario tenere in considerazione la risposta magnetica \mathbf{M} , ma possiamo limitare la nostra descrizione agli effetti della polarizzazione elettrica. Il vettore \mathbf{P} descrive il momento di dipolo elettrico per unità di volume all'interno del materiale, causato dall'allineamento dei dipoli microscopici con il campo elettrico. Esso è legato alla densità di carica interna tramite $\nabla \cdot \mathbf{P} = -\rho$. La conservazione di carica ($\nabla \cdot \mathbf{J} = -\partial\rho/\partial t$), richiede inoltre che la carica interna e la densità di corrente siano correlati attraverso la seguente relazione:

$$\mathbf{J} = \frac{\partial \mathbf{P}}{\partial t} \quad (2.3)$$

Il grande vantaggio di questo approccio è che il campo elettrico macroscopico include tutti gli effetti di polarizzazione. In altre parole, sia il campo esterno sia quello indotto possono essere inclusi nel campo elettrico macroscopico. Possiamo vedere infatti sostituendo la 2.2b a nella 2.1a a che

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho_{tot}}{\varepsilon_0} \quad (2.4)$$

In seguito ci limiteremo ad analizzare media lineari isotropi e amagnetici. Si possono quindi definire le seguenti relazioni costitutive

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \varepsilon \mathbf{E} \quad (2.5a)$$

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mu \mathbf{H} \quad (2.5b)$$

ε è chiamata permittività o costante dielettrica relativa e $\mu = 1$ è la permeabilità relativa del mezzo amagnetico. La relazione lineare 2.5a tra \mathbf{D} ed \mathbf{E} è spesso implicitamente definita utilizzando la suscettibilità dielettrica χ [4] che descrive la relazione lineare tra \mathbf{P} ed \mathbf{E} tramite

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 \chi \mathbf{E} \quad (2.6)$$

¹ $\varepsilon_0 \approx 8.854 \times 10^{-12} F/m$

² $\mu_0 \approx 1.257 \times 10^{-6} H/m$

Inserendo 2.2a e 2.6 nella 2.5a otteniamo $\varepsilon = 1 + \chi$. L'ultima importante relazione lineare costitutiva, che dobbiamo ricordare, è il legame tra le densità di corrente \mathbf{J} interna e il campo elettrico \mathbf{E} , questo può essere determinato tramite la conducibilità σ

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} \quad (2.7)$$

Andiamo ora a dimostrare che vi è una relazione intrinseca tra ε e ρ di conseguenza i fenomeni elettromagnetici nei metalli possono essere descritti anche tramite la conducibilità ρ . Solitamente, alle basse frequenze, si preferisce far riferimento alla conducibilità, mentre nell'ambito sperimentale, dove solitamente si lavora a frequenze ottiche più elevate, viene preferita l'espressione in termini di costante dielettrica. Tuttavia prima di procedere dobbiamo ricordare che le equazioni costitutive 2.5a e 2.7 sono corrette solamente nel caso di mezzi lineari che non presentino dispersioni temporali o spaziali. Nel caso non lineare la risposta ottica dei metalli dipende dalla frequenza ed eventualmente anche dal vettore d'onda, è necessario tener conto della non stazionarietà nel tempo e nello spazio. Diventa quindi necessario generalizzare le espressioni nel seguente modo:

$$\mathbf{D}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \int dt' d\mathbf{r}' \varepsilon(\mathbf{r} - \mathbf{r}', t - t') \mathbf{E}(\mathbf{r}', t') \quad (2.8a)$$

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}, t) = \int dt' d\mathbf{r}' \sigma(\mathbf{r} - \mathbf{r}', t - t') \mathbf{E}(\mathbf{r}', t') \quad (2.8b)$$

Abbiamo quindi che $\varepsilon_0 \varepsilon$ e σ descrivono la risposta dell'impulso nella rispettiva relazione lineare. Si noti, inoltre, che abbiamo implicitamente supposto che tutte le scale di lunghezza siano significativamente più grandi della distanza reticolare del materiale, assicurandone quindi l'omogeneità. Cioè le risposte all'impulso non dipendono dalle coordinate spaziali o temporali assolute, ma solo dalle differenze. Per una risposta locale la forma della funzione di risposta all'impulso è una δ -function e di conseguenza le equazioni 2.5a e 2.7 sono valide. Le equazioni 2.8a e 2.8b si semplificano notevolmente utilizzando la trasformata di Fourier $\int dt d\mathbf{r} e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t)}$, questo ci permette di trasformare le convoluzioni in prodotti, agevolando i calcoli. Stiamo scomponendo così i campi in singole componenti di onde piane del vettore d'onda \mathbf{K} alla frequenza angolare ω . Quanto appena detto porta alle seguenti relazioni costitutive nel dominio di Fourier

$$\mathbf{D}(\mathbf{K}, \omega) = \varepsilon_0 \varepsilon(\mathbf{K}, \omega) \mathbf{E}(\mathbf{K}, \omega) \quad (2.9a)$$

$$\mathbf{J}(\mathbf{K}, \omega) = \sigma(\mathbf{K}, \omega) \mathbf{E}(\mathbf{K}, \omega) \quad (2.9b)$$

Utilizzando le equazioni 2.2a e 2.3 e 2.9 e ricordando che nel dominio di Fourier $\partial/\partial t \rightarrow -i\omega$, arriviamo a definire il rapporto fondamentale tra

la permittività relativa, che d'ora in poi chiameremo funzione dielettrica del metallo

$$\varepsilon(\mathbf{K}, \omega) = 1 + \frac{i\sigma(\mathbf{K}, \omega)}{\varepsilon_0\omega} \quad (2.10)$$

Nell'interazione tra luce e metalli, la forma generale della risposta dielettrica $\varepsilon(\omega, \mathbf{K})$ può essere semplificata al limite di una risposta spazialmente locale tramite $\varepsilon(\mathbf{K} = \mathbf{0}, \omega) = \varepsilon(\omega)$. La semplificazione sopra applicata è valida finché la lunghezza d'onda λ nel materiale è più lunga di tutte le dimensioni caratteristiche; tra le quali anche la dimensione della cella unitaria (o cammino medio degli elettroni). Questo in generale è rispettato anche per frequenze nel range dell'ultravioletto. Alle basse frequenze ε è di solito utilizzato per la descrizione delle conseguenze del campo guida che porta ad una polarizzazione elettrica, mentre σ descrive il contributo al flusso di corrente delle cariche libere. A frequenze ottiche tuttavia, la distinzione tra cariche libere e legate è offuscata e quindi nella nostra trattazione tutte le cariche saranno assunte come cariche libere. Ad esempio, per semiconduttori altamente drogati la risposta degli elettroni in banda di valenza potrebbe essere assimilata ad un costante dielettrica statica $\delta\varepsilon$ e ad una risposta in termini di conduzione di elettroni σ' . Questo porta ad una funzione dielettrico $\varepsilon = \delta\varepsilon + i\sigma'$. Ora se consideriamo $\delta\varepsilon \rightarrow 1$ e $\sigma' \rightarrow \sigma' + \frac{\varepsilon_0\omega}{i}\delta\varepsilon$ otteniamo la forma generale 2.10 [5]. In generale $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ e $\sigma(\omega) = \sigma_1(\omega) + i\sigma_2(\omega)$ sono funzioni complesse a valori di ω (frequenza angolare), legate tra loro dall'equazione 2.10. A frequenze ottiche ε può essere determinato sperimentalmente. Ad esempio, attraverso studi di riflessività che portano alla determinazione dell'indice complesso di rifrazione del mezzo $\tilde{n}(\omega) = n(\omega) + i\kappa(\omega)$, che sappiamo essere definito come $\tilde{n} = \sqrt{\varepsilon}$. Quanto detto produce:

$$\varepsilon_1 = n^2 - \kappa^2 \quad (2.11a)$$

$$\varepsilon_2 = 2n\kappa \quad (2.11b)$$

$$n^2 = \frac{\varepsilon_1}{2} + \frac{1}{2}\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2} \quad (2.11c)$$

$$\kappa = \frac{\varepsilon_2}{2n} \quad (2.11d)$$

κ è detto coefficiente di estinzione e determina l'assorbimento ottico delle onde elettromagnetiche che si propagano attraverso il mezzo. Esso è collegato al coefficiente di assorbimento α della legge di Lambert-Beer.

$$\alpha(\omega) = \frac{2\kappa(\omega)\omega}{c} \quad (2.12)$$

La legge di Lambert-Beer descrive l'attenuazione esponenziale dell'intensità di un fascio che si propaga in un mezzo attraverso la seguente legge: $I(x) = I_0 e^{-\alpha x}$.

Pertanto, la parte immaginaria ε_2 della funzione dielettrica, determina la quantità di assorbimento all'interno del mezzo. Per $|\varepsilon_1| \ll |\varepsilon_2|$, la parte reale n dell'indice di rifrazione è determinata principalmente da ε_1 . Possiamo quindi concludere che la parte reale di σ determina la quantità di assorbimento, mentre la parte immaginaria contribuisce ad ε_1 e quindi alla quantità di polarizzazione.

2.1.1 Applicazione ai plasmoni di superficie

Per studiare le proprietà fisiche dei plasmoni di superficie (Surface Plasmon Polaritons SPPs) è necessario applicare le equazioni di Maxwell, introdotte nel paragrafo precedente (equazioni 2.1). Per prima cosa, è indispensabile introdurre le equazioni in forma generale applicabili alla guide d'onda. In assenza di carica elettrica esterna possiamo combinare le equazioni 2.1c, 2.1d nel seguente modo

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{D}}{\partial t^2} \quad (2.13)$$

Utilizzando ora le relazioni $\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} \equiv \nabla(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E}$ e $\nabla \cdot (\varepsilon \mathbf{E}) \equiv \mathbf{E} \cdot \nabla \varepsilon + \varepsilon \nabla \cdot \mathbf{E}$, e ricordando che in assenza di sollecitazioni esterne $\nabla \cdot \mathbf{D} = 0$, possiamo riscrivere la 2.13 nel seguente modo

$$\nabla \left(-\frac{1}{\varepsilon} \mathbf{E} \cdot \nabla \varepsilon \right) - \nabla^2 \mathbf{E} = -\mu_0 \varepsilon_0 \varepsilon \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} \quad (2.14)$$

Per variazioni trascurabili del profilo dielettrico $\varepsilon = \varepsilon(\mathbf{r})$, su distanze nell'ordine di lunghezza dell'onda ottica, possiamo semplificare nel seguente modo l'equazione centrale della teoria delle onde elettromagnetiche (2.2)

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0 \quad (2.15)$$

Questa equazione deve essere risolta prima nelle regioni a ε costante, successivamente le soluzioni ottenute devono essere poi valutate con le opportune condizioni al contorno. Per applicare l'equazione 2.15 alla descrizione di onde che si propagano all'interfaccia tra due mezzi, occorre procedere in due passi. In primo luogo assumiamo una dipendenza temporale armonica del campo elettrico $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}(\mathbf{r}) e^{-i\omega t}$, otteniamo quindi

$$\nabla^2 \mathbf{E} + k_0^2 \varepsilon \mathbf{E} = 0 \quad (2.16)$$

Dove $k_0 = \frac{\omega}{c}$ è il vettore d'onda di propagazione nel vuoto. L'equazione 2.16 è nota come *Equazione di Helmholtz*. Ora è necessario definire la geome-

tria di propagazione. Assumiamo per semplicità un problema unidimensionale cioè in cui ε dipende solo da una delle coordinate spaziali. In particolare le onde si propagano lungo la direzione x del sistema di coordinate cartesiane, non mostrando alcuna variazione spaziale nella perpendicolare alla direzione y (figura 2.1), quindi $\varepsilon = \varepsilon(z)$.

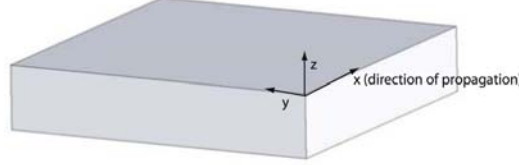


Figura 2.1: Definizione della geometria planare della guida d'onda. L'onda si propaga lungo la direzione x del sistema di coordinate cartesiane

Nel nostro caso possiamo descrivere il campo elettromagnetico nel seguente modo: $\mathbf{E}(x, y, z) = \mathbf{E}(z)e^{i\beta x}$ dove il piano $z = 0$ coincide con l'interfaccia di propagazione. Il parametro complesso $\beta = k_x$ è chiamato costante di propagazione delle onde e corrisponde alla componente del vettore d'onda nella direzione di propagazione. Inserendo questa espressione nella 2.16 si ottiene la forma desiderata dell'equazione d'onda:

$$\frac{\partial^2 \mathbf{E}(z)}{\partial z^2} + (k_0^2 \varepsilon - \beta^2) \mathbf{E} = 0 \quad (2.17)$$

Allo stesso modo si può ricavare la relazione corrispondente per il campo magnetico \mathbf{H} . La 2.17 è il punto di partenza per l'analisi generale dei modi elettromagnetici nelle guide d'onda. Per utilizzare l'equazione d'onda per la determinazione del profilo del campo spaziale e il vettore di propagazione, è necessario ottenere delle espressioni esplicite per le diverse componenti del campo \mathbf{E} e \mathbf{H} . Ciò può essere ottenuto in modo semplice utilizzando le equazioni 2.1c e 2.1d. Ricordando la dipendenza temporale di tipo armonico $\frac{\partial}{\partial t} = -i\omega$, otteniamo il seguente set di equazioni:

$$\frac{\partial E_z}{\partial y} - \frac{\partial E_y}{\partial z} = i\omega\mu_0 H_x \quad (2.18a)$$

$$\frac{\partial E_x}{\partial z} - \frac{\partial E_z}{\partial x} = i\omega\mu_0 H_y \quad (2.18b)$$

$$\frac{\partial E_y}{\partial x} - \frac{\partial E_x}{\partial y} = i\omega\mu_0 H_z \quad (2.18c)$$

$$\frac{\partial H_z}{\partial y} - \frac{\partial H_y}{\partial z} = i\omega\varepsilon_0 \varepsilon E_x \quad (2.18d)$$

$$\frac{\partial H_x}{\partial z} - \frac{\partial H_z}{\partial x} = i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_y \quad (2.18e)$$

$$\frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} = i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_z \quad (2.18f)$$

Per la propagazione lungo la direzione x ($\frac{\partial}{\partial x} = i\beta$) e l'omogeneità nella direzione y ($\frac{\partial}{\partial y} = 0$) il sistema di equazioni 2.18 può essere semplificato nel seguente modo:

$$\frac{\partial E_y}{\partial z} = -i\omega\mu_0 H_x \quad (2.19a)$$

$$\frac{\partial E_x}{\partial z} - i\beta E_z = -i\omega\mu_0 H_y \quad (2.19b)$$

$$-i\beta E_y = -i\omega\mu_0 H_z \quad (2.19c)$$

$$\frac{\partial H_y}{\partial z} = -i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_x \quad (2.19d)$$

$$\frac{\partial H_x}{\partial z} - i\beta H_z = -i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_y \quad (2.19e)$$

$$-i\beta H_y = -i\omega\varepsilon_0\varepsilon E_z \quad (2.19f)$$

Si può facilmente dimostrare che questo sistema restituisce due insiemi di soluzioni autoconsistenti con differenti proprietà di polarizzazione delle onde di propagazione. Il primo insieme di soluzioni sono dette *TM* (*modi Trasversi Magnetici*) o *p polarizzate*, dove solo le componenti E_x , E_z e H_y sono diverse da zero, mentre le soluzioni del secondo insieme sono dette *TE* (*modi Trasversi Elettrici*) o *s polarizzate*, dove solo le componenti H_x , H_z e E_y sono diverse da zero. Per la modalità TM il sistema di equazioni 2.19 si riduce a:

$$E_x = -i \frac{1}{\omega\varepsilon_0\varepsilon} \frac{\partial H_y}{\partial z} \quad (2.20a)$$

$$E_z = -\frac{\beta}{\omega\varepsilon_0\varepsilon} H_y \quad (2.20b)$$

L'equazione d'onda per la modalità TM è data da:

$$\frac{\partial^2 H_y}{\partial z^2} + (k_0^2\varepsilon - \beta^2) H_y = 0 \quad (2.20c)$$

Per la modalità TE invece avremo che il set 2.19 si semplifica nel seguente modo:

$$H_x = i \frac{1}{\omega \mu_0} \frac{\partial E_y}{\partial z} \quad (2.21a)$$

$$H_z = \frac{\beta}{\omega \mu_0} E_y \quad (2.21b)$$

L'equazione d'onda per la modalità TE è data da:

$$\frac{\partial^2 E_y}{\partial z^2} + (k_0^2 \varepsilon - \beta^2) E_y = 0 \quad (2.21c)$$

Con queste equazioni siamo ora in grado di intraprendere la descrizione dei plasmoni di superficie.

2.2 Plasmoni di superficie in singola interfaccia

La più semplice geometria per ottenere SPP (*Surface Plasmon Polaritons*) è quella di una singola interfaccia piana (figura 2.2) tra un dielettrico ($z > 0$) con ε_d reale positivo, ed un regione conduttiva adiacente ($z < 0$) descritta tramite una funzione dielettrico $\varepsilon_m(\omega)$. Il requisito dei metalli implica che $Re[\varepsilon_m] < 0$. Questa condizione è soddisfatta a frequenze inferiori rispetto alla frequenza ω_p . Imponiamo che l'onda sia confinata alla superficie, per fare questo assumeremo un andamento evanescente dell'onda lungo z

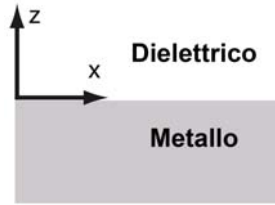


Figura 2.2: Geometria per la propagazione degli SPP a singola interfaccia

Riprendiamo le soluzioni della modalità TM (equazioni 2.20) per analizzare entrambi i mezzi: Per $z > 0$

$$H_y(z) = A_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (2.22a)$$

$$E_x(z) = i A_d \frac{1}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_d} k_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (2.22b)$$

$$E_z(z) = -A_m \frac{1}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_d} e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (2.22c)$$

Per $z < 0$

$$H_y(z) = A_m e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (2.23a)$$

$$E_x(z) = -i A_m \frac{1}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_m} k_m e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (2.23b)$$

$$E_z(z) = -A_m \frac{1}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_m} e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (2.23c)$$

Dove $k_i \equiv k_{z,i}$ ($i = m, d$) è la componente del vettore d'onda perpendicolare all'interfaccia dei due mezzi. Il suo valore reciproco, $\hat{z} = 1/|k_z|$, definisce il decadimento evanescente dei campi in direzione perpendicolare all'interfaccia, e quantificando il confinamento dell'onda. La continuità di H_y e $\varepsilon_i E_z$ all'interfaccia richiede che $A_m = A_d$ e

$$\frac{k_d}{k_m} = -\frac{\varepsilon_d}{\varepsilon_m} \quad (2.24)$$

Con la convenzione dei segni utilizzata, visibile negli esponenziali delle equazioni 2.22 e 2.23, e le condizioni di confinamento dell'onda $Re[\varepsilon_m] < 0$ se $\varepsilon_d > 0$, ci avremo che le onde di superficie sono presenti solamente all'interfaccia tra materiali aventi segni opposti della parte reale della permittività dielettrica. Questo vuol dire che le onde di superficie si presentano solo nell'interfaccia tra un materiale conduttore e uno isolante.

L'espressione di H_y deve inoltre soddisfare l'equazione d'onda 2.20c, otteniamo quindi:

$$k_m^2 = \beta^2 - k_0^2 \varepsilon_m \quad (2.25a)$$

$$k_d^2 = \beta^2 - k_0^2 \varepsilon_d \quad (2.25b)$$

Combinando queste ultime equazioni con la 2.24 arriviamo al risultato fondamentale, cioè otteniamo la relazione di dispersione dei polaritoni plasmonici:

$$\beta = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \quad (2.26)$$

Questa espressione è valida sia per la parte reale e complessa, cioè per conduttori con o senza attenuazione. Vediamo ora cosa accade se siamo in modalità di polarizzazione TE. Utilizzando la 2.21, abbiamo che le rispettive componenti del campo sono:

Per $z > 0$

$$E_y(z) = A_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (2.27a)$$

$$H_x(z) = -iA_d \frac{1}{\omega\mu_0} k_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (2.27b)$$

$$H_z(z) = A_d \frac{\beta}{\omega\mu_0} k_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (2.27c)$$

Per $z < 0$

$$E_y(z) = A_m e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (2.28a)$$

$$H_x(z) = iA_m \frac{1}{\omega\mu_0} k_m e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (2.28b)$$

$$H_z(z) = A_m \frac{\beta}{\omega\mu_0} k_d e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (2.28c)$$

La continuità di E_y e H_x all'interfaccia porta alla condizione:

$$A_1 (k_1 + k_2) = 0 \quad (2.29)$$

Il confinamento alla superficie richiede che $Re[k_1] > 0$ e $Re[k_2] > 0$ e tale condizione è soddisfatta solo se $A_1 = 0$ e quindi essendo $A_1 = A_2 = 0$. Pertanto non esistono modi TE per la polarizzazione della superficie. Possiamo concludere che i plasmoni di superficie esistono solo in regime di polarizzazione TM.

2.3 La funzione dielettrica dei metalli

Per un ampio spettro di frequenze le proprietà ottiche dei metalli possono essere spiegate attraverso un *modello del plasma*, in cui abbiamo un gas di elettroni liberi con densità n che si muovono su uno sfondo fisso costituito da nuclei di ioni positivi. Per i metalli alcalini questa gamma di frequenze si estende fino alla banda ultravioletta, mentre per i metalli nobili le transizioni inter-banda avvengono solo alle frequenze visibili, limitando quindi la validità di questo approccio. Nel modello del plasma le interazioni di potenziale tra reticolo e elettrone-elettrone non sono tenute in considerazione. Si suppone che alcuni aspetti della struttura a bande vengano incorporati nella massa ottica efficace m di ogni elettrone. Gli elettroni oscillano in risposta al campo elettromagnetico applicato, e il loro movimento viene attenuato dalle collisioni che avvengono tra elettroni. Queste si verificano con frequenza tipica di collisione $\gamma = 1/\tau$ con τ noto come tempo di rilassamento del gas di elettroni liberi, tipicamente dell'ordine dei $10^{-14}s$ a temperatura ambiente. Il che corrisponde ad un $\gamma = 100THz$. Possiamo quindi scrivere la seguente equazione del moto per un elettrone immerso nel plasma e soggetto ad un campo elettrico esterno E

$$m\ddot{\mathbf{x}} + m\gamma\dot{\mathbf{x}} = -e\mathbf{E} \quad (2.30)$$

Se assumiamo una dipendenza temporale di tipo armonico per il campo elettrico $\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t}$, avremo che una particolare soluzione di questa equazione che descrive l'oscillazione dell'elettrone è $\mathbf{x}(t) = x_0 e^{-i\omega t}$. E' possibile dunque descrivere con una semplice equazione il moto di un elettrone all'interno del plasma sottoposto ad un campo elettrico E . L'ampiezza complessa x_0 include anche eventuali sfasamenti tra il campo guida e la risposta:

$$\mathbf{x}(t) = \frac{e}{m(\omega^2 + i\gamma\omega)} \mathbf{E}(t) \quad (2.31)$$

Lo spostamento degli elettroni comporta la polarizzazione macroscopica $\mathbf{P} = -ne\mathbf{x}$ esplicitamente data da:

$$\mathbf{P} = -\frac{ne^2}{m(\omega^2 + i\gamma\omega)} \mathbf{E} \quad (2.32)$$

Inserendo l'espressione di \mathbf{P} nell'equazione 2.2a otteniamo:

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega}\right) \mathbf{E} \quad (2.33)$$

Dove $\omega_p^2 = \frac{ne^2}{\varepsilon_0 m}$ è detta frequenza del plasma del gas di elettroni liberi. Siamo perciò arrivati all'espressione della funzione del dielettrico di un gas di elettroni

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (2.34)$$

La parte reale e quella immaginaria di questa funzione dielettrico complessa $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ sono date da

$$\varepsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (2.35a)$$

$$\varepsilon_2(\omega) = \frac{\omega_p^2 \tau}{\omega(1 + \omega^2 \tau^2)} \quad (2.35b)$$

Dove $\gamma = 1/\tau$. E' intuitivo quindi procedere studiando la 2.34 a diversi regimi di frequenza rispetto alla frequenza di collisione γ . In seguito ci limiteremo ad analizzare i metalli per frequenze $\omega < \omega_p$ per la quale essi mantengono il carattere metallico. Per frequenze elevate prossime a ω_p , il prodotto $\omega\tau \gg 1$ porta ad uno smorzamento trascurabile. Sotto queste condizioni abbiamo quindi che ω_p è reale, possiamo scrivere dunque l'espressione di $\varepsilon(\omega)$ semplificata

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (2.36)$$

L'espressione 2.36 può essere pensata come la funzione dielettrica. Consideriamo ora il caso in cui il regime di frequenza sia molto basso, cioè dove $\omega \gg \tau^{-1}$. Avremo quindi che $\varepsilon_2 \gg \varepsilon_1$ e inoltre la parte reale e quella immaginaria dell'indice di rifrazione complesso sono di grandezza comparabile

$$n \approx \kappa = \sqrt{\frac{\varepsilon_2}{2}} = \sqrt{\frac{\tau\omega_p^2}{2\omega}} \quad (2.37)$$

In questo intervallo di frequenze i metalli presentano un coefficiente di assorbimento

$$\alpha = \left(\frac{2\omega_p^2}{c^2} \right)^{1/2} \quad (2.38)$$

Introducendo la conducibilità di corrente continua σ_0 questa espressione può essere riformulata, ricordando che $\sigma_0 = \frac{ne^2\tau}{m} = \omega_p^2\tau\varepsilon_0$

$$\alpha = \sqrt{2\sigma_0\omega\mu_0} \quad (2.39)$$

L'applicazione della legge di Lambert-Beer, relativa all'assorbimento, implica che per basse frequenze all'interno del metallo i campi si riducono con andamento esponenziale $e^{-z/\delta}$, dove δ è la profondità a cui ci troviamo

$$\delta = \frac{2}{\alpha} = \frac{c}{\kappa\omega} = \sqrt{\frac{2}{\sigma_0\omega\mu_0}} \quad (2.40)$$

Una discussione più rigorosa sul comportamento a bassa frequenza dell'equazione di trasporto di Boltzmann [3] dimostra che questa descrizione è effettivamente valida fino a quando il cammino libero degli elettroni $l = \nu_F\tau \gg \delta$, dove ν_F è la velocità di Fermi. A temperatura ambiente per i metalli più utilizzati $l \approx 10nm$ e $\delta \approx 100nm$; questi due parametri validano quindi il modello a elettroni liberi che abbiamo introdotto. Per le frequenze del visibile l'applicabilità del modello a elettroni liberi non è più valida a causa del verificarsi di transizioni inter-banda che portano quindi ad un aumento della parte immaginaria della funzione dielettrica ε_2 . Può essere utile ora collegare la funzione dielettrica del plasma di elettroni liberi (eq. 2.34) al modello classico di Drude [6] attraverso la conducibilità AC $\sigma(\omega)$ dei metalli. Ciò può essere ottenuto riconoscendo che l'equazione 2.30 può essere riscritta nel seguente modo

$$\dot{\mathbf{p}} = -\frac{\mathbf{p}}{\tau} - e\mathbf{E} \quad (2.41)$$

Dove $\mathbf{p} = m\dot{\mathbf{x}}$ è la quantità di moto di un singolo elettrone libero. Sfruttando le argomentazioni di cui sopra, arriviamo alla seguente espressione AC della conducibilità $\sigma = \frac{ne\mathbf{p}}{m}$

$$\sigma(\omega) = \frac{\sigma_0}{1 - i\omega\tau} \quad (2.42)$$

Confrontando ora le equazioni 2.34 e 2.42 otteniamo

$$\varepsilon(\omega) = 1 + \frac{i\sigma(\omega)}{\varepsilon_0\omega} \quad (2.43)$$

Disponiamo quindi anche della funzione dielettrica del gas di elettroni liberi anche con il modello della risposta ottica dei metalli di Drude.

2.4 Estensione spaziale e lunghezza di propagazione dei plasmoni di superficie

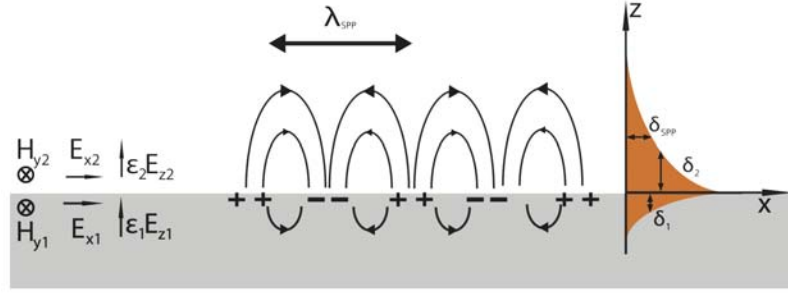


Figura 2.3: Rappresentazione schematica della propagazione dei plasmoni di superficie all'interfaccia metallo dielettrico

Per quanto detto nei paragrafi precedenti i plasmoni di superficie sono localizzati all'interfaccia tra il layer metallico e il dielettrico. Il campo elettromagnetico ha ampiezza che decresce esponenzialmente allontanandosi in direzione ortogonale all'interfaccia, direzione z in figura 2.3. Alla distanza $d_z = \frac{1}{|z_{zi}|}$ il campo decresce di un fattore $1/e$. Per il mezzo dielettrico avremo:

$$d_{z>0} = \frac{1}{\sqrt{k_{SPP}^2 - \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_d}} = \frac{\frac{c}{\omega}}{\sqrt{\frac{\varepsilon_d\varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m} - \varepsilon_d}} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{\varepsilon_d + \varepsilon_m}{-\varepsilon_d^2}} \quad (2.44)$$

Dove λ è la lunghezza d'onda della fascio luminoso incidente e $k_{SPP} = k_x$. Analogamente per il mezzo metallico:

$$d_{z<0} = \frac{1}{\sqrt{k_{SPP}^2 - \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_m}} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{\varepsilon_d + \varepsilon_m}{-\varepsilon_m^2}} \quad (2.45)$$

Dalla relazione di dispersione dei plasmoni di superficie 2.26 otteniamo:

$$\beta = k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d(\varepsilon_{m,1} + i\varepsilon_{m,2})}{\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1} + i\varepsilon_{m,2}}} \quad (2.46)$$

$$= \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d(\varepsilon_{m,1} + i\varepsilon_{m,2})(\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1} - i\varepsilon_{m,2})}{(\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1})^2 + \varepsilon_{m,2}^2}} \quad (2.47)$$

$$\approx \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d^2\varepsilon_{m,1} + \varepsilon_d\varepsilon_{m,1}^2 + i\varepsilon_d^2\varepsilon_{m,2}}{(\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1})^2}} \quad (2.48)$$

$$= \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d\varepsilon_{m,1}}{\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1}} \left(1 + i \frac{\varepsilon_d\varepsilon_{m,1}}{\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1}} \frac{\varepsilon_{m,2}^2}{\varepsilon_{m,1}} \right)} \quad (2.49)$$

$$= \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d\varepsilon_{m,1}}{\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1}}} + i \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_d\varepsilon_{m,1}}{\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1}} \right)^{3/2} \frac{\varepsilon_{m,2}}{2\varepsilon_{m,1}^2} \quad (2.50)$$

Ora possiamo scomporre k_x nella sua parte reale e immaginaria:

$$\Re k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d\varepsilon_{m,1}}{\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1}}} \quad (2.51)$$

$$\Im k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\left(\frac{\varepsilon_d\varepsilon_{m,1}}{\varepsilon_d + \varepsilon_{m,1}} \right)^3 \frac{\varepsilon_{m,2}}{2\varepsilon_{m,1}^2}} \quad (2.52)$$

Al termine immaginario è associata l'attenuazione evanescente tipica dei plasmoni di superficie. La lunghezza L a cui l'intensità si attenua del coefficiente $1/e$ è dunque data da:

$$L = \frac{1}{2\Im k_x} \quad (2.53)$$

2.5 Eccitazione dei plasmoni di superficie

I plasmoni di superficie che si propagano all'interfaccia piana tra un conduttore e un dielettrico sono essenzialmente onde elettromagnetiche bidimensionali. Il confinamento si ottiene poiché la costante di propagazione β è maggiore del vettore d'onda k nel dielettrico, con conseguente decadimento evanescente su entrambi i lati dell'interfaccia. In questo capitolo andremo a vedere due tecniche particolari per ottenere l'eccitazione dei plasmoni di superficie.

2.5.1 Accoppiamento con prisma

In condizioni di interfaccia metallo/dielettrico piana i plasmoni di superficie non possono essere eccitati direttamente da fasci luminosi aventi $k_x < \beta$, dove k è il vettore d'onda della luce sul lato dielettrico dell'interfaccia. Pertanto la proiezione lungo l'interfaccia del momento di fotoni incidenti $k_x = k \sin \theta$ è sempre minore della costante di propagazione β , anche nel caso di incidenza radente alla superficie; impedendo così il l'accoppiamento di fase. Tuttavia, la condizione di uguaglianza dei momenti della luce incidente e del vettore di propagazione dei SPP può essere ottenuto attraverso un sistema a tre layer, costituito da un sottile strato di metallo tra due dielettrici aventi costanti dielettriche diverse. Per semplicità consideriamo l'aria come uno dei due dielettrici, avente $\varepsilon = 1$. Un fascio riflesso all'interfaccia tra un isolante ad elevata costante dielettrica ε , solitamente un prisma (vedi figura 2.4) e il metallo, avrà un momento sul piano $k_x = k_0 \sqrt{\varepsilon} \sin \theta$ sufficiente per eccitare gli SPPs all'interfaccia tra il metallo e il dielettrico a costante dielettrica più bassa, nel nostro caso quindi nell'interfaccia con l'aria. In questo modo gli

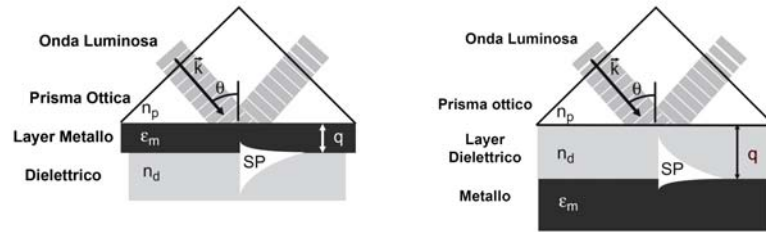


Figura 2.4: Accoppiamento prismatico utilizzando la configurazione Kretschmann (sinistra) e Otto (destra)

SPPs con costante di propagazione β compresa tra la linea luminosa dell'aria e quella del dielettrico a indice di rifrazione maggiore possono essere eccitati (figura 2.5) L'eccitazione degli SPPs sopra descritta si manifesta con un minimo dell'intensità del fascio riflesso. L'accoppiamento di fase degli SPPs all'interfaccia prisma/metallo non può essere raggiunto, poiché come possiamo vedere in figura 2.5 la rispettiva dispersione SPP si trova al di fuori del cono di sotteso dalla le linee luminose dell'aria e del prisma. Sono possibili due differenti geometrie di accoppiamento utilizzando il prisma illustrate in figura 2.4. La configurazione più comune è quella di Kretschmann [7] nella quale una sottile pellicola metallica viene depositata sulla base di un prisma in vetro. Il fascio di fotoni entra da un lato del prisma con un angolo maggiore dell'angolo critico per la riflessione interna totale, portando all'eccitazione degli SPPs all'interfaccia metallo/aria. Un'altra configurazione è quella di Otto [8] in cui il prisma è separato dal film metallico da un sottile

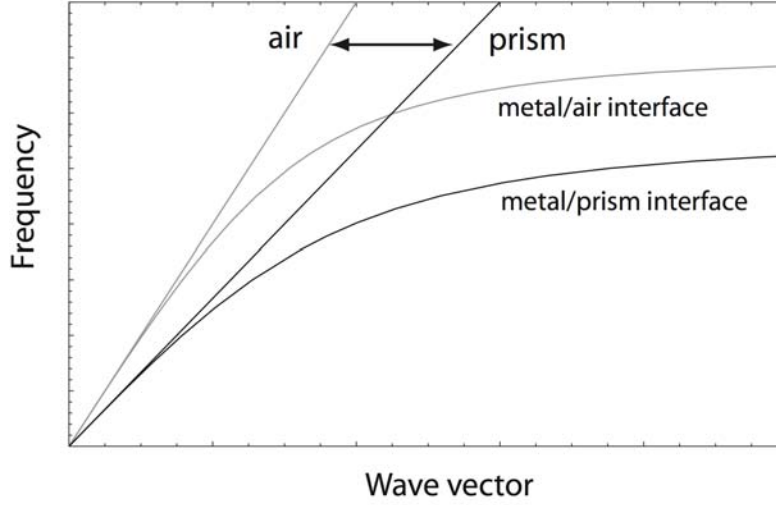


Figura 2.5: Accoppiamento con prisma e dispersione SPP. Solo le costanti di propagazione comprese tra le linee luminose di aria e prisma (solitamente in vetro) sono accessibili, risulta un ulteriore smorzamento degli SPP dovuto all'irraggiamento. Avremo dunque che gli SPP eccitati hanno costante di propagazione all'interno del cono luce-prisma)

strato dielettrico d'aria. La riflessione totale interna avviene nell'interfaccia prisma/aria, e quindi gli SPP eccitati si presentano all'interfaccia aria/metal. Questa configurazione è preferibile nelle prove in cui si desidera evitare un contatto diretto con la superficie metallica, come ad esempio nel caso di studi sulla qualità della superficie. Il minimo nell'intensità del fascio riflesso è dovuto all'interferenza distruttiva tra le radiazioni di perdita e la parte di fascio di eccitazione riflesso. Per uno spessore del film metallico ottimale l'interferenza distruttiva può essere totale, restituendo quindi uno zero nella intensità del fascio riflesso. In questo caso la radiazione di dispersione non può essere quindi rilevata. Usando un'analisi di questo sistema basata sulle equazioni di Fresnel, si può dimostrare che questo caso ottimale si ottiene se lo smorzamento Γ_{LR} dovuto alla radiazione di dispersione è pari allo smorzamento Γ_{abs} dovuta all'assorbimento (accoppiamento critico). $\Gamma_{abs} = \Im[\beta_0]$ dove β_0 è la costante di propagazione SPP alla singola interfaccia calcolata tramite la 2.26. Per uno strato metallico con funzione $\varepsilon_1(\omega)$ che rispetta le condizione $|\Re[\varepsilon_1]| \gg 1$ e $|\Im[\varepsilon_1]| \ll |\Re[\varepsilon_1]|$, il coefficiente di riflessione può essere rappresentato attraverso l'approssimazione Lorentziana

$$R = 1 - \frac{4\Gamma_{LR}\Gamma_{abs}}{[\beta - (\beta_0 + \Delta\beta)]^2 + (\Gamma_{LK} + \Gamma_{abs})^2} \quad (2.54)$$

E' evidente che la costante di propagazione dei SPP β del sistema prisma/metallo/aria viene traslata di una quantità pari a $|\Re[\Delta\beta]|$ rispetto al valore alla singola interfaccia β_0 . La parte immaginaria $\Im[\Delta\beta] \equiv \Gamma_{LK}$ descrive il contributo della radiazione di smorzamento alla perdita totale. $\Delta\beta$ può essere espresso mediante un calcolo di coefficienti di riflessione di Fresnel e dipende dallo strato metallico. La tecnica di accoppiamento prismatico è adatta per eccitare gli SPPs sia nella configurazione geometrica MIM (Metallo Isolante Metallo) sia nella configurazione IMI (Isolante Metallo Isolante).

2.5.2 Accoppiamento con grating

Un altro approccio per l'eccitazione ottica dei plasmoni di superficie si basa sulla diffrazione della luce che si propaga in reticolo di diffrazione [9]. In questo metodo abbiamo un'onda incidente prima su un dielettrico, avente indice di rifrazione n_d , e poi su di una nanostruttura periodica metallica avente costante dielettrica ε_m , periodo del reticolo Λ e ampiezza q . Quando un'onda luminosa con vettore d'onda k viene fatta incidere sulla superficie del reticolo avranno luogo una serie di onde diffratte, e il vettore d'onda della luce diffratta sarà:

$$\mathbf{k}_m = \mathbf{k} + m\mathbf{G} \quad (2.55)$$

Dove m è un numero intero e indica l'ordine di diffrazione e \mathbf{G} è il vettore reticolo [10]. Il vettore del reticolo giace sul piano del reticolo, cioè il piano yz di figura 2.6, ed è perpendicolare alle scanalature del reticolo. La sua dimensione è inversamente proporzionale al passo del reticolo, possiamo quindi esprimere la geometria del reticolo nel seguente modo:

$$G = \frac{2\pi}{\Lambda} \quad (2.56)$$

Pertanto, la componente del vettore d'onda della luce diffratta perpendicolare al piano del reticolo k_{xm} è uguale a quella dell'onda incidente, mentre la componente d'onda nel piano del reticolo di rifrazione k_{zm} viene alterata dal reticolo di diffrazione:

$$k_{zm} = k_z + m\frac{2\pi}{\Lambda} \quad (2.57)$$

Le onde diffratte possono accoppiarsi con i plasmoni di superficie quando la costante di propagazione dell'onda diffratta k_{zm} lungo la superficie del reticolo e quella dei plasmoni di superficie β^{SP} si equivalgono:

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_d \sin \theta + m\frac{2\pi}{\Lambda} = k_{zm} = \pm \Re \{ \beta^{SP} \} \quad (2.58)$$

Dove:

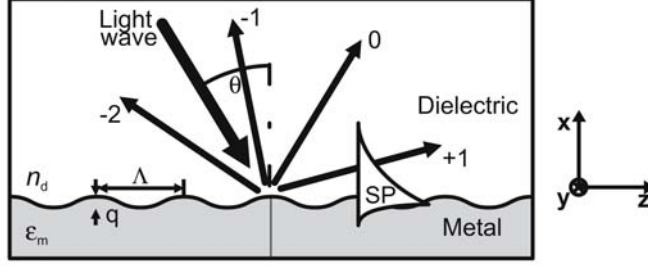


Figura 2.6: Eccitazione dei plasmoni di superficie con diffrazione della luce attraverso un reticolo di diffrazione

$$\beta^{SP} = \beta^{SP_0} + \Delta\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} + \Delta\beta \quad (2.59)$$

β^{SP_0} indica la costante di propagazione dei plasmoni lungo l'interfaccia piana tra un metallo e un dielettrico, mentre $\Delta\beta$ spiega la presenza del reticolo. In termini di indice efficace, la condizione di accoppiamento può essere riscritta come:

$$n_d \sin \theta + m \frac{\lambda}{\Lambda} = \pm \left(\Re \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \right\} + \Delta n_{ef}^{SP} \right) \quad (2.60)$$

Dove $\Delta n_{ef}^{SP} = \Re \{ \Delta\beta / 2\pi \}$ La condizione di accoppiamento tra l'onda di luce diffratta e la plasmonica di superficie è illustrata in figura 2.7. Come possiamo vedere i diversi ordini di diffrazione possono essere utilizzati per soddisfare la condizione di accoppiamento. L'indice effettivo dell'onda luminosa è approssimativamente una funzione lineare della lunghezza d'onda con pendenza pari a m/Λ , la quale è positiva per $m > 0$ e negativa per $m < 0$. La condizione di accoppiamento 2.60 può essere verificata per diverse combinazioni dell'angolo di incidenza, passo del reticolo, e ordine di diffrazione. Per gli ordini di diffrazione positivi la lunghezza d'onda di accoppiamento aumenta al decrescere dell'angolo di incidenza, mentre per gli ordini di diffrazione negativi la lunghezza d'onda di accoppiamento aumenta all'aumentare dell'angolo di incidenza.

L'interazione tra onda luminosa e i plasmoni di superficie mediata dal reticolo, può essere studiata risolvendo le equazioni di Maxwell in forma differenziale e integrale. Nel metodo differenziale il profilo associato al reticolo è approssimato ad un insieme di strati omogenei sovrapposti in cui la soluzione delle equazioni di Maxwell stesse è calcolata in forma di serie di Rayleigh; e la soluzione totale del problema di diffrazione viene trovata applicando le condizioni al contorno per ciascuna interfaccia [11],[12]. Il metodo integrale, invece, assume la presenza di un flusso di corrente sulla superficie del reticolo, e riduce il problema al calcolo dell'integrale di Helmholtz-Kirchhoff [13].

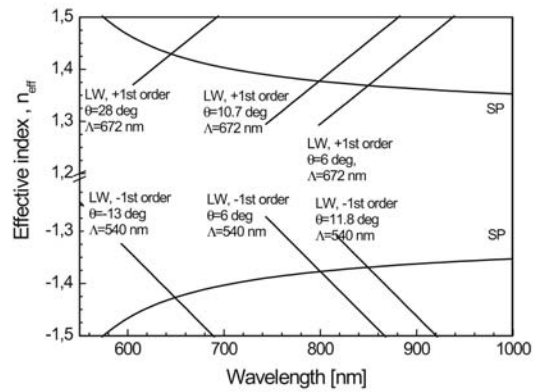


Figura 2.7: Dipendenza spettrale dell'indice effettivo di SPP in un'interfaccia oro/acqua e indice di rifrazione della onda luminosa incidente in un grating calcolato per due casi con diverso periodo di grating e tre differenti angoli di incidenza

In seguito andremo a simulare il comportamento dei dispositivi grating con il metodo differenziale (RCWA Rigorous Coupled Wave).

Capitolo 3

Biosensori basati su Risonanza Plasmonica (SPR)

Nei capitoli precedenti abbiamo compreso e dimostrato come la costante di propagazione dei plasmoni di superficie sia sensibile alle variazioni dell'indice di rifrazione del dielettrico. Questa caratteristica ha permesso di sviluppare sensori ottici in grado di individuare le variazioni dell'indice di rifrazione sulla superficie andando a valutare l'eccitazione dei SPP attraverso un fascio luminoso. In questo capitolo andremo quindi ad introdurre un tipo di biosensori basati sul fenomeno di risonanza plasmonica di superficie (Surface Plasmon Resonance SPR) valutandone le performance caratteristiche.

3.1 Sensori SPR

Un sensore ottico è un dispositivo in grado di trasformare, attraverso il sistema cui è collegato, la grandezza da misurare (*misurando*) in un'altra quantità che nel nostro sensore viene codificata nelle proprietà di un'onda luminosa. In un sensore SPR in cui si ha l'eccitazione dei plasmoni di superficie all'interfaccia tra la superficie metallica e il dielettrico, quello che andremo a misurare in particolare sarà la variazione dell'indice di rifrazione [14]. Un cambio dell'indice di rifrazione produce una variazione della costante di propagazione dei plasmoni di superficie. Questa variazione altera la condizione di accoppiamento tra l'onda luminosa e i plasmoni di superficie, osservabile nelle caratteristiche dell'onda luminosa riflessa o trasmessa che interagisce con i plasmoni di superficie (vedi schema concettuale in figura 3.1). A seconda del parametro caratteristico che andiamo ad osservare i sensori SPR si possono classificare in sensori con modulazione in angolo, lunghezza d'onda, intensità, fase o polarizzazione.

- **Sensori SPR con modulazione angolare:** questi sensori utilizzano un fascio luminoso incidente monocromatico. Uno dei punti di forza

di questa tecnica è dato dal fatto che l'accoppiamento tra il fascio luminoso incidente e i plasmoni di superficie è osservabile per diversi angoli di incidenza. Viene scelto, però, come segnale di output del nostro sensore, l'angolo d'incidenza che consente l'accoppiamento più forte. L'uscita del sensore può essere calibrata in funzione dell'indice di rifrazione [15].

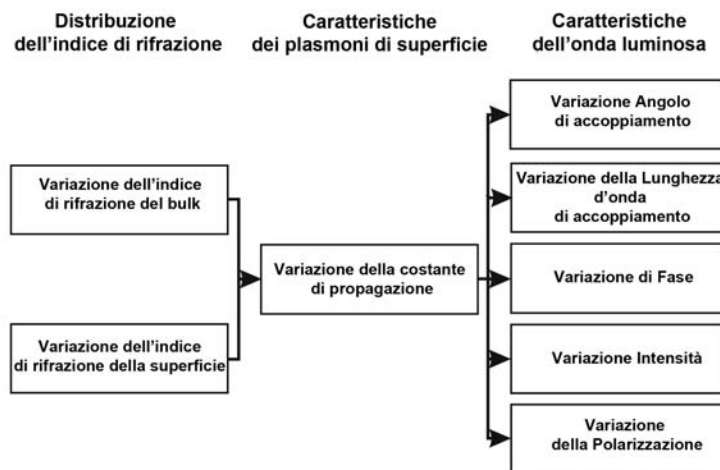


Figura 3.1: Concetto di sensore SPR

- **Sensori SPR con modulazione in lunghezza d'onda:** i plasmoni di superficie sono eccitati da un fascio luminoso collimato contenente diverse lunghezze d'onda e l'angolo d'incidenza sulla superficie metallica è fissato. L'accoppiamento, come nel caso della modulazione angolare, avviene per diverse lunghezze d'onda, ovviamente come nel caso precedente prenderemo come output del sensore la lunghezza d'onda in cui l'accoppiamento risulta essere più forte [16].
- **Sensori SPR con modulazione in intensità:** l'angolo di incidenza e la lunghezza d'onda sono fissati, viene fatta variare l'intensità del fascio luminoso in modo da avere l'accoppiamento massimo [17].
- **Sensori SPR con modulazione in fase:** l'angolo di incidenza e la lunghezza d'onda sono fissati, viene misurato lo shift in fase introdotto dall'interazione del fascio luminoso incidente con i plasmoni di superficie eccitati [18].
- **Sensori SPR con modulazione in polarizzazione:** si misurano i cambiamenti della polarizzazione della fascio luminoso che interagisce con i plasmoni di superficie [19].

I sensori SPR possono effettuare direttamente o indirettamente la misura dell'indice di rifrazione. Nel caso di misura indiretta abbiamo che il misurando agisce su di una grandezza intermedia che poi, a sua volta, modula le caratteristiche del fascio luminoso trasmesso o riflesso che andremo a osservare. I biosensori SPR per affinità che vedremo nel paragrafo successivo sono dei particolari sensori SPR indiretti.

3.1.1 Biosensori SPR per affinità

I sensori SPR sono sensori affini e quindi in quanto tali presentano elementi di bioriconoscimento, come ad esempio degli anticorpi, che sono in grado di interagire con dei particolari analiti, fungendo da trappole. Queste trappole sono immobilizzate nella superficie metallica nel quale avviene l'eccitazione dei plasmoni di superficie. Avremo quindi che quando una soluzione contenente lo specifico analita riconosciuto dal ligando, si lega alla molecola trappola provoca una variazione dell'indice di rifrazione della superficie. La variazione dell'indice di rifrazione, per quanto visto nei capitoli precedenti, modifica la costante di propagazione dei plasmoni di superficie, che a sua volta modifica alcuni parametri dell'onda luminosa trasmessa o riflessa. La variazione dell'indice di rifrazione Δn_b indotta dal legame dell'analita con le trappole dipende dall'incremento dell'indice di rifrazione nel volume di riferimento $(dn/dc)_{vol}$, e si può esprimere nel seguente modo:

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc} \right)_{vol} \Delta c_b \quad (3.1)$$

Dove Δc_b è la concentrazione dell'analita di interesse espressa in *massa/volume*. Il valore dell'incremento dell'indice di rifrazione dipende dalla struttura degli analiti e varia tra $0.1mLg^{-1}$ e $0.3mL/g$ [20],[21]. Il legame trappola/analita provoca una variazione dello spessore h del dielettrico, possiamo quindi esprimere la variazione dell'indice di rifrazione in funzione di questa variazione di spessore dello strato:

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc} \right)_{vol} \frac{\Delta \Gamma}{h} \quad (3.2)$$

Dove Γ denota la concentrazione superficiale *massa/area* [22].

Per quanto detto fin'ora i biosensori basati su SPR consentono quindi di misurare direttamente le interazioni tra le biomolecole senza la necessità di marcarle ad esempio con tecniche in fluorescenza. Questa caratteristica ha permesso ai sensori SPR di diventare strumenti essenziali per la caratterizzazione delle interazioni molecolari. Essi infatti consentono: di misurare direttamente e in tempo reale le interazioni, di determinare quantitativamente i parametri cinetici, termodinamici, e la concentrazione, oppure caratterizzare i rapporti tra ligandi e analiti [9].

3.2 Processo di funzionalizzazione della superficie dei sensori SPR

Le prime prove di utilizzo dei sensori SPR in campo bioanalitico si basavano sul semplice adsorbimento fisico di proteine alla superficie metallica attiva. Emerse successivamente la necessità di sviluppare un approccio più sofisticato che permetta di avere un adsorbimento il più possibile sotto il controllo dell'operatore [25]. I substrati metallici comunemente usati (oro e argento) mostrano una forte tendenza all'adsorbimento di proteine o altre molecole. Nella superficie attiva dei biosensori SPR sono state implementate molteplici tecniche di riconoscimento chimico biologico di specifici analiti. La tecnica scelta per il riconoscimento dipende fondamentalmente dalle dimensioni della molecola target, dal tipo di legame che viene a formarsi tra l'elemento di riconoscimento (ligando) e l'analita, e dalla concentrazione dell'analita stesso nella soluzione che vogliamo analizzare. I metodi più diffusi per il riconoscimento di molecole in soluzione sono i seguenti [9]:

- **Riconoscimento diretto:** si tratta della tecnica sicuramente più semplice e meno costosa. L'elemento bioriconoscitore viene immobilizzato direttamente sulla superficie attiva del sensore SPR. In questo modo abbiamo che l'analita legandosi alla sonda (figura 3.2) modifica in maniera rilevabile l'indice di rifrazione effettivo del dielettrico.

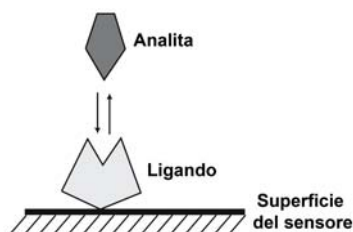


Figura 3.2: L'analita libero in soluzione può legarsi alla molecola immobilizzata (ligando) [9]

Questa tecnica solitamente viene utilizzata nel caso in cui le dimensioni dell'analita siano sufficienti per provocare una variazione dell'indice di rifrazione percepibile dal nostro biosensore.

- **Riconoscimento indiretto:** questa tecnica è di fondamentale importanza nel caso in cui le dimensioni del solo analita non comportino una variazione dell'indice di rifrazione percepibile dal sistema. Una volta che l'analita si è legato alla sonda immobilizzata sulla superficie, si procede legando sopra all'analita un altro anticorpo (figura 3.3 a)) in modo che la variazione dell'indice di rifrazione sia percepibile.

- **Riconoscimento competitivo:** in questo sistema sono presenti due analiti in competizione, cioè entrambi in grado di legarsi alla sonda di riconoscimento (figura 3.3 b)). Solitamente uno degli analiti si trova legato ad una molecola proteica (e.g. albumina o caseina bovina). I due analiti sono mescolati in soluzione, con concentrazione dell'analita coniugato predeterminata, e vengono fatti interagire con la superficie di rilevamento. La risposta del sensore sarà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in soluzione.
- **Riconoscimento inibitorio:** il campione in analisi viene preincubato con le sonde specifiche per l'analita bersaglio, però non tutte le sonde si legheranno all'analita (figura 3.3 c)). Successivamente la miscela viene iniettata nella superficie attiva del sensore SPR ricoperta dalle molecole di analita. Avremo quindi che le sonde che non si sono legate ai target nella fase di preincubazione potranno ora legarsi ai target immobilizzati sulla superficie del sensore. Come nel riconoscimento competitivo la risposta del sensore sarà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita nella fase di incubazione.

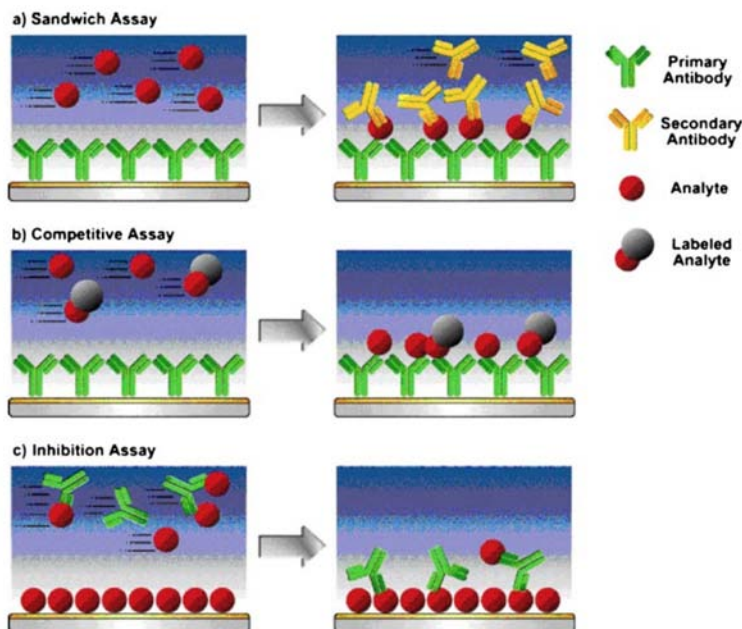


Figura 3.3: a) Riconoscimento indiretto b) riconoscimento competitivo c) riconoscimento inibitorio

3.2.1 Self Assembled Monolayers

I Self Assembled Monolayers (SAM) sono assemblati organici formati dall'adsorbimento delle componenti molecolari in soluzione o in fase gassosa sulla superficie di solidi o in array regolari su superfici liquide. Essi forniscono un sistema economico, flessibile e semplice con cui modificare le proprietà superficiali di metalli, ossidi metallici e semiconduttori. Le superfici metalliche e gli ossidi metallici tendono ad adsorbire facilmente i materiali organici con i quali vengono a contatto. Questo è dovuto al fatto che, una volta adsorbiti, questi riducono l'energia libera di interfaccia tra il metallo (o l'ossido di metallo) e la molecola organica [25]. Una volta adsorbiti questi possono alterare le proprietà superficiali e influenzare in maniera significativa la stabilità delle eventuali nanostrutture presenti sull'interfaccia. Il materiale organico può: agire come barriera fisica o elettrostatica contro l'aggregazione, diminuire la reattività degli atomi o agire come pellicola elettricamente isolante. Le superfici ricoperte con questi composti non sono solitamente ben definite, non hanno cioè una funzionalizzazione chimica specifica, e le proprietà fisiche non sono riproducibili (e.g. conducibilità, bagnabilità o resistenza alla corrosione). Le molecole o i ligandi che formano i SAM hanno dei gruppi con particolare funzionalità chimica. I gruppi di testa (*headgroups*) hanno una elevata affinità per la superficie in questione e dislocano l'adsorbimento degli elementi organici. Esistono un elevato numero di headgroups che si legano a specifici metalli, ossidi metallici e semiconduttori. La classe di Self-Assembled Monolayers più studiata deriva dall'adsorbimento di alcantioli su oro, argento, rame, palladio, platino e mercurio. L'elevata affinità dei tioli con le superfici dei metalli nobili permette di generare superfici organiche ben organizzate e con funzionalità chimiche ben definite.

I SAM sono essi stessi delle nanostrutture con un elevato numero di proprietà utili. Lo spessore di un SAM è tipicamente compreso tra 1nm e 3nm ed è la forma più elementare di un materiale organico a film su scala nanometrica. La composizione molecolare del SAM coincide con la sua composizione osservata perpendicolarmente alla superficie. Questa caratteristica rende possibile l'uso di sintesi organica per adattare le strutture in modo che il controllo della posizione raggiunga una precisione prossima ai 0.1nm . I SAM sono particolarmente adatti per gli studi nel campo delle tecnologie delle nanoscienze in quanto:

- Sono facili da preparare e non richiedono attrezzature specializzate nella loro preparazione
- Si adsorbono su oggetti di tutte le dimensioni e sono componenti critici per la stabilizzazione e l'aggiunta di gruppi funzionali alla superficie.
- E' possibile rilevare le modifiche alle proprietà della superficie attraverso misure elettroniche (risposte corrente-tensione e elettrochimiche)

o con dispositivi ottici (indice di rifrazione locale e eccitazione dei plasmoni di superficie)

- Producono effetti macroscopici all'interfaccia come bagnabilità, adesione o attrito.

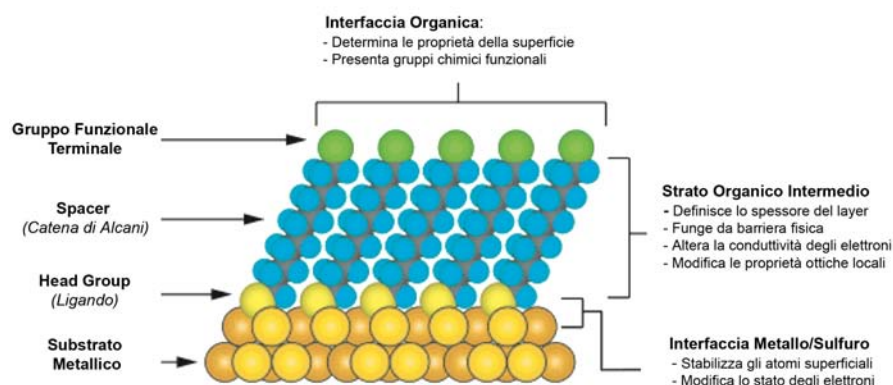


Figura 3.4: Diagramma schematico di una singola struttura cristallina di SAM costituito da una molecola generica supportata in una superficie d'oro nanostrutturata.

Descrizione dei SAM

I primi studi presenti in letteratura si occupavano principalmente di SAM formati dall'assorbimento di organosolfuri. Questi primi esperimenti hanno potuto stabilire molte delle caratteristiche di base come la struttura della superficie, l'organizzazione della catena e l'orientamento. Inoltre si sono definiti i protocolli di preparazione dei SAM: concentrazioni, periodo di esposizione della superficie, solventi e temperatura. Sono stati studiati anche alcuni dettagli relativi alla termodinamica e alla cinetica che governa il processo di assemblaggio. Una parte importante della ricerca sui SAM si è concentrata su nuove tipologie di supporti, e in parte anche nello studio di nuove molecole utilizzabili. In realtà la maggior parte dei substrati studiati per l'adesione dei SAM è costituita da una ristretta gamma di materiali con strati di ossidazione. Negli ultimi anni invece hanno avuto una notevole espansione gli studi che sfruttano l'assemblaggio dei SAM su superfici nanostrutturate. L'applicazione su superfici nanostrutturate oltre al fine di stabilizzare queste ultime, permette di manipolarne anche le proprietà di interfaccia. Le modalità di adsorbimento dei SAM sono molteplici, in seguito andremo a vedere quella più semplice e comune, cioè l'adsorbimento da molecole in soluzione.

- **Adsorbimento di Molecole da una Soluzione** Il protocollo più comune per preparare SAM su oro, argento, palladio, mercurio e altri

materiali, è l'immersione del substrato, preventivamente pulito, in una soluzione contenente le molecole d'interesse con concentrazioni comprese nell'intervallo $1 - 10mM$ per un periodo di 12-18 ore a temperatura ambiente. Questa procedura, ampiamente utilizzata, proviene dai primi studi sui SAM ed è stata successivamente migliorata ottimizzando la riproducibilità e l'efficienza del SAM prodotto. Coperture dense di adsorbanti si possono ottenere rapidamente (dai pochi millisecondi ad alcuni minuti) per immersione, con soluzioni a concentrazioni millimolari. E' invece necessario un processo lento di riorganizzazione dell'ordine di ore per massimizzare la densità delle molecole e minimizzare i difetti di posizionamento. Vi sono, tuttavia, una serie di fattori sperimentali che possono influenzare la struttura del SAM risultante: il solvente, la temperatura, la concentrazione dell'adsorbato, il tempo di immersione, la purezza dell'adsorbato, la concentrazione di ossigeno in soluzione, il livello di pulizia del substrato e la lunghezza della catena o più in generale la sua struttura. Per la maggior parte delle condizioni sperimentali abbiamo comunque la formazione di un SAM con comportamenti funzionali sufficientemente ripetibili. Per alcuni particolari studi sulle proprietà dei materiali come bagnabilità corrosione e processi di trasferimento di carica è necessario comprendere come minimizzare i difetti del SAM e massimizzare l'ordine all'interno di questi sistemi. Gli effetti che hanno alcuni parametri come il tempo di immersione, la concentrazione dell'adsorbato e la lunghezza della catena sulla struttura e sulle proprietà sono note, mentre su parametri come solvente e temperatura non ci sono conoscenze specifiche.

- **Natura dell'Interfaccia Metallo-SAM** La maggior parte dei SAM d'interesse formano un'interfaccia reattiva, cioè l'adsorbato e il substrato sono entrambi modificati dalle reazioni che portano alla formazione del SAM. La chimica in questione per l'assorbimento su oro è in linea di principio la più semplice, ma alcuni di questi processi rimangono comunque sconosciuti, visto che l'oro non forma un ossido superficiale, come ad esempio avviene nell'argento. Nel caso di superfici d'oro la formazione del SAM non sarà complicata da reazioni chimiche atte a ridurre o eliminare gli ossidi sulla superficie. La natura e la disposizione spaziale dei legami metallo solfuro resta comunque di difficile comprensione. Si sa ancora meno sulla formazione di SAM su altri metalli come l'argento, palladio, rame e mercurio. Sono stati effettuati studi dettagliati su tutti questi materiali [25] e si è arrivati alla conclusione che ogni metallo ha una diversa chimica di superficie e che l'organizzazione strutturale si diversifica. Queste variazioni tra i diversi metalli conducono ad una varietà di motivi strutturali differenti. I dettagli strutturali dell'interfaccia sono stati compresi solo in maniera qualitativa. In seguito vedremo la formazione di SAM su substrato

d'argento.

- **Struttura Superficiale delle molecole su substrato Argento** La maggior parte dei SAM supportati su argento e rame mostrano proprietà simili a quelli supportati su oro e palladio. La particolarità dei substrati d'argento è che sulla superficie è presente uno strato di ossido complesso che può trasportare quantità abbastanza significative di contaminanti adsorbiti dall'ambiente. Le interazioni tra i campioni di argento, immersi in una soluzione contenente gli adsorbanti, consentono in genere la rimozione dell'ossido superficiale. L'organizzazione delle catene osservata in questi SAM mostra in cima un film con un motivo dominante. Il legame solfuro-argento può, tuttavia, variare in funzione delle condizioni di preparazione. Immersioni brevi danno un semplice layer, mentre esposizioni prolungate portano alla formazione di solfuro metallico all'interfaccia. Queste ultime fasi non sono ancora state completamente caratterizzate, ma non sembrano influenzare le strutture e l'organizzazione delle catene delle molecole.
- **Organizzazione del Layer Organico** La disposizione geometrica delle molecole di zolfo sulla superficie, e la distanza tra i più vicini atomi superficiali di metallo sono fattori che determinano il limite superiore della densità delle molecole. Questa densità bidimensionale può non corrispondere con la densità raggiungibile dalle molecole in forma cristallina. Questo vuol dire che la disposizione dei legami delle molecole solfuro sulla superficie può impedire la massimizzazione delle interazioni laterali tra le componenti organiche del SAM. Per ridurre al minimo l'energia libera dello strato organico le molecole adottano conformazioni che consentono elevati gradi di Van der Waals, e in alcuni casi si formano legami idrogeno, con le molecole adiacenti. Queste interazioni producono un livello secondario di organizzazione che risulta essere importante nella determinazione di alcune proprietà macroscopiche del SAM come la bagnatura.
- **Modello a Singola Catena per la Descrizione dello Strato Organico in SAM** E' sufficiente rappresentare il SAM con un semplice modello a catena singola per facilitare il confronto tra le organizzazioni ottenute con diversi composti, e soprattutto per comprendere le diverse conformazioni lineari che vengono a formarsi su substrati diversi. Due parametri descrivono le variazioni dell'*orientamento delle molecole* organiche nel SAM:
 - Angolo di inclinazione della catena lineare della molecola rispetto alla normale alla superficie α .
 - Rotazione attorno all'asse longitudinale della molecola β

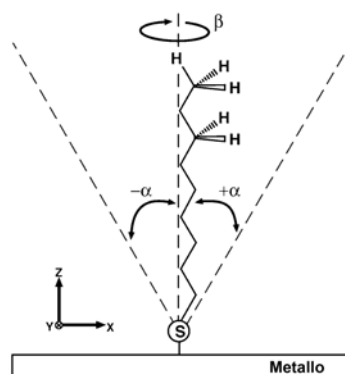


Figura 3.5: Vista schematica di una singola molecola del SAM. L'angolo di inclinazione α è definito rispetto la direzione normale alla superficie, l'angolo di torsione β descrive la rotazione del piano del legame rispetto all'asse della catena

Come definito in nella figura 3.5, α può assumere valori sia positivi che negativi, compresi tra 0° e 90° . Per SAM formati su oro, palladio, argento, rame, mercurio, platino le catene adottano una struttura quasi cristallina, e sono completamente estese. L'inclinazione delle catene varia a seconda del metallo su cui si forma il SAM. Le ampiezze più elevate per l'angolo α le abbiamo nel caso dell'oro, con un valore assoluto di $\alpha \approx 30^\circ$. Nel caso di substrato in argento l'angolo rispetto alla normale alla superficie è molto ridotto $\alpha \approx 10^\circ$, nel caso del mercurio le catene si dispongono perpendicolarmente alla superficie e quindi $\alpha \approx 0^\circ$. Il valore medio dell'angolo β nel caso dell'oro è prossimo ai 50° , mentre per gli altri metalli i valori di β si concentrano attorno ai 45° .

3.2.2 Tecniche di immobilizzazione

L'evoluzione della tecnologia SPR ha favorito lo sviluppo di numerose tecniche per l'immobilizzazione di diversi tipi di elementi di riconoscimento, soprattutto proteine ma anche DNA e RNA, strutture di carboidrati e molecole organiche di vario genere. Sono state quindi sviluppate, successivamente al semplice adsorbimento, tecniche di immobilizzazione sofisticate. Queste si basano su processi chimici covalenti che consentono un elevato controllo del processo. In figura 5.2.3 possiamo vedere tre delle tecniche di immobilizzazione più diffuse. Andremo a vedere ora la descrizione generale della tecniche di immobilizzazione utilizzata nelle nostre prove sperimentali.

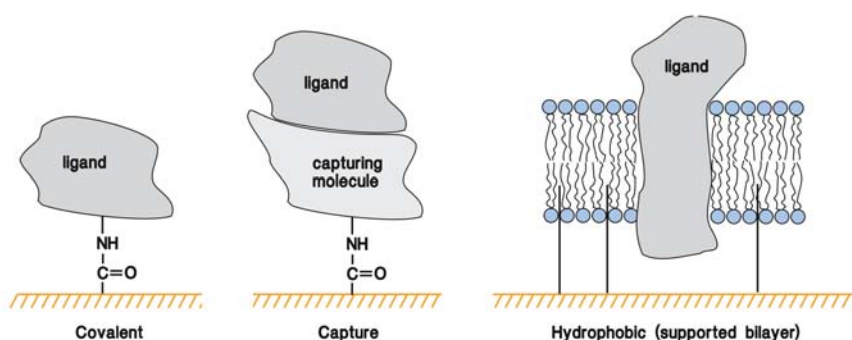


Figura 3.6: Differenti tecniche di immobilizzazione sulla superficie del sensore SRP

Accoppiamento dei nucleofili ai gruppi carbossilici

Un approccio versatile e molto diffuso prevede l'accoppiamento di nucleofili reattivi funzionali con i gruppi carbossilici. I gruppi carbossilici, dopo la deposizione del SAM, risultano esposti sulla superficie del sensore SPR [9]. Il nucleofilo più utilizzato è il gruppo amminico in residui di lisina, ma possono essere usati anche gruppi idrossilici. Nel caso dei SAM in cui sono esposti i gruppi carbossilici della molecola PEG, è possibile effettuare su questi il processo di immobilizzazione. Il gruppo carbossilico serve per: raggiungere la formazione di un legame covalente con l'ammina o il gruppo idrossilico, e l'attivazione con reagenti carbodiimmidici. Il legame solitamente avviene in due fasi: l'attivazione seguita dalla reazione, questo per evitare la reazione tra carbodiimmide e la molecola immobilizzata. Tuttavia in soluzioni acquose la reattività della soluzione intermedia è così elevata che l'idrolisi dell'acqua riporta velocemente allo stato precedente di acido carbossilico, se non viene intercettato da un nucleofilo concorrente. Questo inconveniente viene facilmente risolto utilizzando una miscela di carbodiimmide e un composto idrossilico reattivo. Si forma così un derivato dell'estere attivo che è stabile per un periodo che va da parecchi minuti a qualche ora (figura 3.7). N-idrossi succinimide (NHS) è stato individuato come un reagente molto

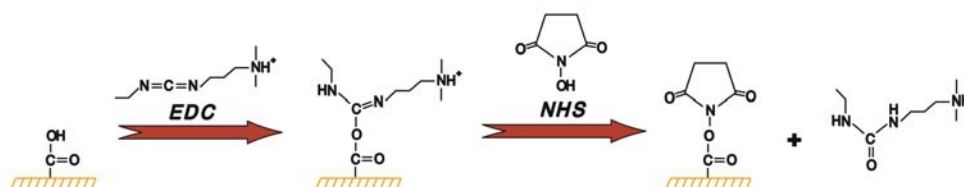


Figura 3.7: Sequenza di attivazione dei gruppi carbossilici con EDC/NHS

adatto a questi scopi e viene normalmente miscelato ad alte concentrazioni di EDC in acqua. EDC e NHS fungono anche da soluzione tampone portando il pH attorno a 5-6, fornendo così le condizioni ottimali per la formazione di esteri da parte del NHS. Anche altri composti, in grado di formare esteri, come il nitro-fenolo e i suoi derivati possono essere utilizzati. Solitamente viene preferito l’NHS grazie alla sua elevata solubilità in acqua, alla tossicità relativamente bassa e alla reattività ottimale per l’accoppiamento a due stadi. Studi di ottimizzazione estesi sono stati condotti sulle condizioni di attivazione e di accoppiamento per l’immobilizzazione di proteine sulla superficie carbossimetilata del sensore [27]. L’accoppiamento con gli esteri attivi può essere effettuato in diverse condizioni a seconda del tipo molecolare. Gli spostamenti in soluzioni acquose sono normalmente realizzati in condizioni leggermente alcaline, ad esempio in tamponi carbonato o borato con pH 8,5, dove un normale nucleofilo alchilammina è vicino al suo costante di dissociazione (o protolisi) acida (pK_a) e può quindi competere con l’idrolisi dell’acqua. Questo metodo è quello preferito anche nel caso di molecole organiche o piccoli peptidi. Queste condizioni sono state utilizzate ampiamente anche nell’immobilizzazione di proteine per cromatografia di affinità [26]. Un approccio alternativo è stato sviluppato per immobilizzare proteine in situ sulla superficie del sensore, nel quale modifiche ad alta densità sono desiderabili. Questo concetto si basa sull’attrazione elettrostatica delle proteine ad una superficie carbossilata attivata dal NHS, nella quale una frazione dei gruppi carbossilici non ha subito la reazione. In condizioni di forza ionica del buffer ridotta, dove la superficie è caricata negativamente e la proteina ha una carica positiva, si ottiene una elevata concentrazione superficiale della proteina stessa. Ciò favorisce notevolmente la reazione dei nucleofili sulle proteine nel caso di idrolisi in acqua degli esteri. Le condizioni del tampone, adatte per raggiungere questo obiettivo, sono ottenute con una concentrazione $10mM$ di acetato a pH 4–6, in cui una larga parte delle proteine sono cariche positivamente [27]. Possono quindi essere utilizzate concentrazioni di proteine molto più basse in accoppiamento con fasi solide. I tempi di reazione risultano quindi molto più brevi (1–10min). L’approccio basato sull’attrazione elettrostatica può essere applicato a tutte le superfici che hanno un combinazione di gruppi reattivi e cariche residue. Le implementazioni più di successo, però, si trovano per superfici 3D come il destrano carbossimetilato. In questo caso l’attrazione porta a multistrati di proteine. Nelle prove più frequenti presenti in letteratura vengono utilizzate proteine marcate radioattivamente, queste evidenziano concentrazioni superficiali fino a $50ngmm^{-2}$. Queste prove vengono utilizzate anche per calibrare i sensori SPR e rappresentano la densità massima per molte delle proteine tipicamente utilizzate. Inoltre l’accoppiamento avviene in condizioni molto blande, in cui solo una piccola frazione dei gruppi nucleofili della proteina sono reattivi (ad esempio, i gruppi amminici sui residui di lisina sono senza protoni). Quanto detto in precedenza porta ad avere pochi punti di immobilizzazione, poca o nessuna

reticolazione e un'elevata probabilità di preservare l'attività delle proteine. Ad esempio, la proteina A immobilizzata sotto queste condizioni mostra la capacità di potersi legare a tre molecole di immunoglobuline G (IgG) per ogni molecola della proteina [27].

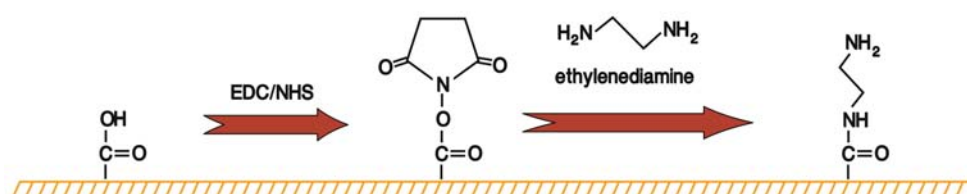


Figura 3.8: Modifica della superficie del sensore con gruppi amminici tramite la reazione di attivazione EDC/NHS e etilendiammina

Allo stesso modo gli anticorpi IgG immobilizzati sono in grado di legarsi con gli antigeni specifici. In particolare la loro capacità di legame è pari a 1.5 antigeni per anticorpo e il 75% dell'attività di legame si concentra su due siti di legame per l'antigene [28]. Questi risultati sono in netto contrasto con i risultati che sono stati ottenuti in letteratura nell'immobilizzazione di anticorpi monoclonali per supporti di cromatografia, dove sono stati individuati bassi livelli di attività compresi nell'intervallo [1 – 30%].

In alcuni casi è preferibile un approccio inverso, cioè con i gruppi funzionali amminici posizionati sulla superficie del sensore e i gruppi carbossilici attivati. Questa strategia può essere utilizzata quando alla molecola da immobilizzare mancano le opportune ammine attive o altri nucleofili. Oppure nel caso in cui il nucleofilo interessato sia prossimo al sito di legame dell'analita, questo potrebbe modificare i livelli di attività della molecola immobilizzata. Questa tecnica inversa è particolarmente utile anche nel caso in cui si lavori con molecole molto piccole. I gruppi amminici possono essere introdotti sulla superficie del sensore in diversi modi. Un percorso conveniente comporta la conversione di superfici carbossilate tramite l'attivazione EDC/NHS e la successiva reazione dell'etilendiammina. Le superfici funzionalizzate con i gruppi amminici primari devono essere fatte reagire nuovamente, dopo che sono state prodotte, a causa dei gruppi amminici che perdono velocemente la loro reattività in condizioni normali di tampone acquoso [29]. Questo è imputato alla formazione di carbammato dalla reazione con l'anidride carbonica, e dal presentarsi di fenomeni di ossidazione.

3.3 Performance principali dei sensori SPR

Nei sensori SPR rifrattometrici abbiamo che il misurando, cioè l'indice di rifrazione, modula direttamente le caratteristiche del fascio luminoso in analisi. Questo si verifica in tutti i tipi di modulazione per sensori SPR visti

in precedenza. Nei biosensori SPR per affinità solitamente il misurando è la concentrazione dell'analita che si è legato alle sonde di riconoscimento. Questo legame viene osservato come variazione dell'indice di rifrazione rispetto alla condizione fresh (misura senza analita), il quale influisce sulla modulazione dei parametri d'onda. Il comportamento di un sensore in risposta ad un specifico misurando può essere predetto attraverso la funzione di trasferimento del sensore stesso F . Avremo quindi che l'output predetto del nostro sensore, determinato tramite la modellizzazione del suo comportamento o tramite una precisa calibrazione, sarà $Y = F(X)$. Solitamente però i dati realmente misurati ($X_{measurement}$) si scostano dalla modellizzazione (X_{true}):

$$X_{measured} = X_{true} + e \quad (3.3)$$

Dove e è l'errore di misura, le fonti di questo sono molteplici. Alcuni di questi errori possono essere ovviati totalmente o parzialmente attraverso una puntuale calibrazione del dispositivo, come ad esempio nel caso degli errori sistematici. Altri, invece, come gli errori random non sono eliminabili con la calibrazione in quanto sono delle fluttuazioni statistiche in tutte le direzioni. Ovviamente la qualità della calibrazione dipende anche dalla precisione del segnale di calibrazione utilizzato. Le principali caratteristiche che descrivono le performance dei biosensori SPR sono [9]

- **Sensibilità:** è il rapporto tra una variazione della misura fornita dal sensore e la corrispondente variazione del valore reale della grandezza fisica. Se la caratteristica statica è lineare tale rapporto è costante, mentre varia in funzione della misura se essa è non lineare.

$$S = \frac{\partial Y}{\partial X} \quad (3.4)$$

Nel caso dei biosensori SPR la sensibilità rifrattometrica si può riscrivere in funzione dell'indice di rifrazione n

$$S_{RI} = \frac{\partial Y}{\partial n} \quad (3.5)$$

Possiamo esprimere anche la sensibilità in funzione della concentrazione dell'analita c

$$S_c = \frac{\partial Y}{\partial c} \quad (3.6)$$

La sensibilità dei sensori SPR può essere decomposta, come abbiamo appena visto, in due contributi:

$$S_c = \frac{\partial Y}{\partial c} = \frac{\partial Y}{\partial n_b} \frac{dn_b(c)}{dc} = S_{RI} S_{nc} \quad (3.7)$$

Dove S_{RI} è la sensitività dell'output in risposta ai cambiamenti dell'indice di rifrazione, e S_{nc} è derivato dalla variazione dell'indice di

rifrazione n_b causato dal legame analita-elemento di riconoscimento. La sensibilità di un sensore SPR ad un indice di rifrazione S_{RI} può essere suddiviso anch'esso in due parti:

$$S_{RI} = \frac{\delta Y}{\delta n_{ef}} \frac{\delta n_{ef}}{\delta n_b} = S_{RI1} S_{RI2} \quad (3.8)$$

Dove il termine S_{RI1} dipende dal metodo di eccitazione dei plasmoni di superficie e dal metodo di modulazione specifico usato dal sensore, in seguito verrà indicato come contributo strumentale. S_{RI2} invece, descrive la sensibilità dell'indice efficace della plasmonica di superficie alle variazioni dell'indice di rifrazione, esso è indipendente dai metodi di modulazione del sensore e dalla modalità di eccitazione. La sensibilità dei plasmoni di superficie all'indice rifrattivo S_{RI2} dipende dal profilo dell'indice rifrattivo stesso n_b .

- **Linearità:** essa può riguardare il misurando primario (nel nostro caso la concentrazione dell'analita) oppure l'indice di rifrazione. La linearità definisce l'intervallo di lavoro per cui il rapporto tra il misurando e l'uscita del sensore è lineare. La linearità viene solitamente specificata in termini di massimo scostamento da una funzione di trasferimento lineare per un range dinamico specifico. In genere i sensori con funzione di trasferimento lineare sono preferibili, in quanto essi richiedono pochi punti per avere una calibrazione accurata del sensore. Solitamente però la risposta di un biosensore SPR è una funzione non lineare della concentrazione di analita; pertanto deve essere accuratamente calibrato.
- **Risoluzione:** è la più piccola variazione nel misurando che comporta ad una variazione sensibile all'uscita del sensore. Nei sensori SPR la risoluzione è espressa come minima variazione dell'indice di rifrazione di base che produce una variazione apprezzabile dell'output del sensore. L'entità della variazione del segnale d'uscita deve essere tale da non confondersi con il rumore di fondo inevitabilmente presente. Il rumore in uscita del sensore è introdotto dal sistema ottico e dalla componente elettronica del sensore. Le principali fonti di rumore sono:
 - La *fluttuazione dell'intensità* (σ_L) della luce emessa nel nostro caso da un sorgente laser. Il rumore nell'intensità del fascio luminoso emesso è proporzionale all'intensità stessa. Quindi la relativa deviazione standard σ è data da $\sigma_L = \sigma_L^{rel} I$, dove σ_L^{rel} è la deviazione standard relativa (intensità dipendente) e I è l'intensità luminosa rilevata.
 - Le *proprietà statistiche della luce (shot noise)* (σ_S). Lo *shot noise* è associabile all'arrivo random di fotoni in un detector, e corri-

sponde ad una produzione random di fotoelettroni. Le sorgenti di luce convenzionali producono un flusso di fotoni che obbedisce alla legge statistica di Poisson. La legge di Poisson produce un *shot noise* σ_S direttamente proporzionale alla radice quadrata dell'intensità della luce: $\sigma_S = \sigma_S^{rel} \sqrt{I}$. Dove σ_S^{rel} è la deviazione standard relativa (intensità dipendente)[24].

- Il *rumore nella conversione* (σ_D) dell'intensità luminosa attuata nei fotodiodi e nel circuito di supporto. Il *rumore del rilevatore* è costituito da diversi contributi che provengono principalmente dall'incremento di temperatura generato dai fotoelettroni e dalla circuiteria elettronica, la relativa deviazione standard σ_D è indipendente dall'intensità della luce rilevata.

Il rumore della densità luminosa risultante σ_I è la sovrapposizione statistica di tutte le componenti di rumore che abbiamo analizzato, e può essere espresso nel seguente modo:

$$\sigma_I(I) = \sqrt{I^2(\sigma_L^{rel})^2 + I(\sigma_S^{rel})^2 + \sigma_D^2} \quad (3.9)$$

- **Accuratezza:** indica la vicinanza tra il valore misurato e il valore vero del misurando (concentrazione dell'analita o indice di rifrazione). L'accuratezza dei sensori è solitamente espressa in termini assoluti o in percentuale del rapporto *errore/uscita*
- **Riproducibilità:** é la capacità di un sensore di fornire la stessa uscita quando si misura lo stesso valore del misurando, alle medesime condizioni di funzionamento. La riproducibilità è spesso espressa come una percentuale di fondo scala.
- **Range dinamico:** descrive l'insieme di valori che il sensore è in grado di misurare. Nei sensori SPR rifrattivi il range dinamico descrive il range di valori dell'indice di rifrazione che è possibile misurare con elevata accuratezza. Nei biosensori SPR invece definisce il range di concentrazioni di analita che il sensore è in grado di rilevare con una precisa accuratezza, esso si estende dal valore della minima concentrazione percepibile a quello della massima concentrazione.
- **Limit of Detection (LOD):** questo indice definito dall'international Union of Pure and Applied Chemist, consiste nella concentrazione c_l derivabile dalla più piccola misura Y_L che può essere rilevata con ragionevole certezza. Il valore di Y_{LOD} è dato dall'equazione:

$$Y_{LOAD} = Y_{blank} + m\sigma_{blank} \quad (3.10)$$

Dove Y_{blank} è il valore medio delle misure blank (senza analita), σ_{blank} è la deviazione standard delle misure blank e m è un indice numerico che definisce il livello di confidenza desiderato (tipicamente 1 o 2) Per $c_{blank} = 0$, la concentrazione di LOD può essere espressa come:

$$c_{LOD} = \frac{1}{S_c(c=0)} m \sigma_{blank} \quad (3.11)$$

Dove S_c rappresenta la sensitività del sensore alla concentrazione dell'analita. Va notato che questa definizione di LOD riconosce intrinsecamente solo i falsi positivi e che in effetti rende la probabilità di un falso negativo pari al 50%. [23] In letteratura è possibile trovare un altro approccio per la definizione del LOD, dal quale si ottengono due valori indipendenti per la probabilità di falsi positivi e negativi.

- **Limit of Quantification (LOQ):** la prima concentrazione di analita accettata è solitamente quando è pari almeno a 10 deviazioni standard del blank [23]. Pertanto la concentrazione LOQ c_{LOQ} può essere espressa nel seguente modo:

$$c_{LOQ} = \frac{10}{S_c(c=0)} \sigma_{blank} \quad (3.12)$$

3.4 Applicazione dei sensori SPR nell'ambito della sicurezza alimentare

L'individuazione di malattie di origine alimentare e la presenza di contaminanti negli alimenti è una domanda di importanza fondamentale che ha stimolato fortemente la ricerca biosensoristica negli ultimi decenni.

A tutela delle aziende e soprattutto del consumatore si è espressa anche la comunità europea tramite il Regolamento (CE) N.178/2002, pubblicato sulla Gazzetta ufficiale delle Comunità europee in data 1 Febbraio 2002.

Esso stabilisce:

- I principi e requisiti generali della legislazione alimentare
- Istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare
- Fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.

Tra le finalità principali del regolamento c'è quella di garantire un livello elevato della salute umana e degli interessi dei consumatori in relazione agli alimenti, tenendo conto in particolare della diversità dell'offerta di alimenti compresi i prodotti tradizionali, garantendo al contempo l'efficace funzionamento del mercato interno. Esso stabilisce i mezzi per assicurare un solido

fondamento scientifico, procedure e meccanismi organizzativi efficienti a sostegno dell'attività decisionale nel campo della sicurezza alimentare (Articolo 1, Comma 1). E' disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime (Articolo 18).

Il coinvolgimento dell'attività scientifica nell'ambito della sicurezza alimentare viene messo tra le prerogative dal legislatore nei seguenti articoli:

Assistenza scientifica e tecnica (Articolo 31). La commissione può chiedere all'Autorità di prestare assistenza scientifica o tecnica in qualsiasi settore di sua competenza. Detta assistenza consiste in un'attività scientifica o tecnica che comporta l'applicazione di principi scientifici o tecnici consolidati per la quale non è necessaria una valutazione scientifica da parte del comitato scientifico o di un gruppo di esperti scientifici. In particolare, possono rientrare in tale ambito l'assistenza alla Commissione sia per l'istituzione o la valutazione di criteri tecnici sia per l'elaborazione di orientamenti tecnici.

Studi Scientifici (Articolo 32). Avvalendosi delle migliori risorse scientifiche indipendenti disponibili, l'Autorità commissiona studi scientifici necessari all'adempimento delle sue funzioni. Siffatti studi scientifici saranno commissionati in maniera aperta e trasparente. L'Autorità si adopera per evitare ogni inutile sovrapposizione con i programmi di ricerca degli Stati membri o della Comunità e promuove la collaborazione mediante un adeguato coordinamento.

Per garantire i presupposti previsti dal legislatore diventa di fondamentale importanza la capacità di identificare un'eventuale contaminazione dei campioni alimentari. Vi è soprattutto una necessità di tecniche accurate che consentano di rilevare rapidamente la presenza di agenti patogeni negli alimenti. Alcune tecniche tradizionali per l'individuazione di agenti patogeni includono i metodi di coltura [2] la reazione a catena della polimerasi (PCR)[3], la citometria di flusso [4] e la tecnica immunoenzimatica (ELISA)[5]. Queste tecniche però richiedono operatori formati e attrezzature di laboratorio altamente specializzate. Nell'ambito della sicurezza alimentare, per quanto detto anche in precedenza, sono necessari invece sistemi di analisi dinamici, facilmente trasportabili, utilizzabili da personale non specializzato e che consentano di avere le analisi dei campioni in tempi relativamente ristretti.

Molte di queste caratteristiche si possono individuare e sviluppare nell'ambito dei biosensori SPR. Essi sono per prima cosa in grado di effettuare rilevazioni in tempo reale, rendendo così possibile un monitoraggio on-line delle trasformazioni alimentari in atto. I biosensori SPR sono infatti in grado di produrre rivelazioni quantitative sensibili in

meno di un'ora, senza la necessità di utilizzare composti marcanti (e.g. fluorescenza). Affinché i sensori SPR, possano essere definiti come una tecnologia pratica nel settore della sicurezza alimentare, è necessario individuare un approccio economicamente valido e facile da utilizzare nella rilevazione degli analiti nei campioni alimentari. Per raggiungere questo obiettivo i nostri sensori devono essere robusti e devono devono richiedere una scarsa manutenzione. A seconda degli agenti patogeni i livelli minimi di rilevazione variano, e quindi varia la sensibilità dello strumento di misura richiesta. Per mantenere ridotta la percentuale di falsi positivi e falsi negativi è necessario implementare specifiche piattaforme di rilevamento in funzione dell'analisi da effettuare. In seguito andremo a descrivere i meccanismi di rilevazione dei patogeni in base alla dimensione dell'analita. Questa divisione separa gli agenti patogeni in tre categorie: batteri, proteine e molecole dal basso peso molecolare, queste tre categorie presentano diverse sfide tecnologiche per la loro rivelazione. Ad esempio per i batteri, che sono dell'ordine dei micron, il più grande ostacolo per la loro rilevazione è il lento tasso di diffusione sulla superficie di rilevamento. Per quanto riguarda invece le proteine possiamo dire che queste hanno un processo di diffusione e adesione alla superficie sicuramente più efficace. Esse infatti hanno un peso molecolare compreso tra i $5kDa$ e i $150kDa$, questo conferisce alle proteine un elevato tasso di diffusione sulla superficie di rilevamento e aumentando la concentrazione una massa sufficiente per produrre un segnale misurabile. Come abbiamo visto il basso peso molecolare produce una serie di problemi che dovranno essere risolti. In conclusione nel caso delle proteine abbiamo una elevata velocità di diffusione ma una massa che, a basse concentrazioni, non è sufficiente per produrre una risposta misurabile. Non è quindi possibile rilevare direttamente l'analita, ma è necessario utilizzare dei mezzi intermedi.

- **Batteri** I batteri sono, forse, la categoria di patogeni comunemente più rilevata. A causa delle loro dimensioni eccezionalmente grandi e della loro bassa velocità di diffusione la loro detection risulta molto problematica. Per superare questa limitazione sono stati impiegati vari metodi di trattamento dei batteri. L'uccisione dei batteri per trasferimento di calore, ad esempio, può migliorare i limiti di rilevazione. In alternativa, utilizzando etanolo o un detergente per lisare le cellule si formano dei frammenti molto più piccoli che possono essere rilevati molto più facilmente in quanto avendo dimensioni minori aumentano la velocità di diffusione dell'analita sulla superficie di rilevamento
- **Proteine** Le proteine di origine alimentare tossiche sono generalmente quelle secrete dai batteri infettivi. Queste proteine sono generalmente tossiche anche a dosi minime. Come detto in pre-

cedenza il peso molecolare ridotto favorisce la diffusione, ma la loro massa consente una corretta rilevazione solo per concentrazioni elevate. Per concentrazioni ridotte la soluzione può essere quella di utilizzare un sandwich di rilevazione del tipo trappola/bersaglio/marcatore per migliorarne i limiti.

Capitolo 4

Simulazione

L'eccitazione dei plasmoni di superficie può essere descritta attraverso diversi metodi di simulazione. Un metodo di semplice implementazione è il modello d'onda vettoriale, esso si basa sulle equazioni di accoppiamento plasmonico viste nel capitolo 2. Questo metodo ci fornirà la relazione tra la posizione dell'angolo azimutale di accoppiamento plasmonico φ e l'angolo d'incidenza ϑ . Successivamente andremo a studiare il metodo RCWA (Rigorous Coupled Wave Analysis), che consente, a differenza del modello d'onda vettoriale, di ottenere anche i valori dell'ampiezza di riflettanza e trasmittanza.

4.1 Modello basato sulla conservazione del vettore d'onda

Possiamo riscrivere le condizioni necessarie per l'accoppiamento plasmonico viste nel paragrafo 2.6 in dipendenza dall'angolo azimutale φ . Quindi il vettore del grating \mathbf{G} bidimensionale avente andamento sinusoidale sarà espresso nel seguente modo:

$$\mathbf{G} = (G \cos \varphi, G \sin \varphi, 0) \quad (4.1)$$

A sua volta possiamo riscrivere la costante di propagazione plasmonica \mathbf{k} :

$$\mathbf{k} = (k_0 \sin \vartheta_i, 0, -k_0 \cos \vartheta_i) \quad (4.2)$$

Dove $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$. Possiamo riscrivere ora condizione di accoppiamento 2.60 nel seguente modo:

$$k_{SPP,x} = -\eta_d k_0 \sin \vartheta_i + G m \cos \varphi = k_{SPP} \cos \beta = \pm \sqrt{k_{SPP}^2 - k_{SPP,y}^2} \quad (4.3a)$$

$$k_{SPP,y} = G m \sin \varphi = k_{SPP} \sin \beta \quad (4.3b)$$

Dove β è la direzione di propagazione dei plasmoni di superficie nel piano (x, y) . Ora possiamo ricavare il valore del modulo di k_{SPP} dalla 4.3, ed

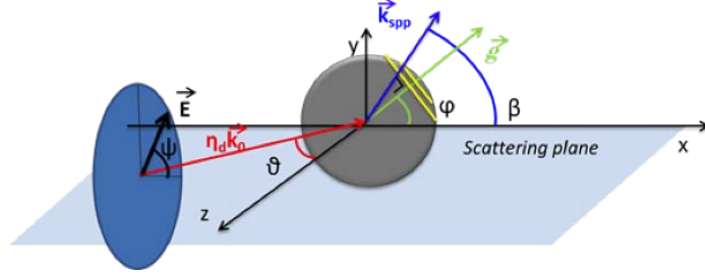


Figura 4.1: Rappresentazione schematica dell'accoppiamento plasmonico con grating

esprimere la condizione di accoppiamento plasmonico:

$$\eta_d^2 k_0^2 \sin^2 \vartheta_i + 2\eta_d k_0 m G \sin \vartheta_i \cos \varphi + m^2 G^2 = K_{SPP}^2 \quad (4.4a)$$

$$k_{SPP} = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \quad (4.4b)$$

L'equazione 4.4 può essere vista come una semplice equazione di secondo grado con φ incognito. Noto quindi l'angolo di incidenza ϑ_i è possibile ricavare l'angolo azimutale φ in corrispondenza del quale abbiamo l'accoppiamento plasmonico. Se stiamo osservando il segnale trasmesso sarà l'angolo azimutale in corrispondenza del quale avremo un massimo della corrente rilevata. Le potenzialità di questa tecnica sono legate soprattutto alla semplicità computazionale con il quale possiamo individuare tutte le coppie (φ, ϑ) in corrispondenza delle quali abbiamo l'accoppiamento plasmonico, come è possibile vedere in figura 4.2. Variando il coefficiente m possiamo ottenere le coppie (φ, ϑ) per i vari ordini di rifrazione. E' possibile vedere anche come al variare dell'indice di rifrazione del layer dielettrico (η_d), le coppie (φ, ϑ) si modificano. Questa tecnica di simulazione verrà utilizzata in seguito per ricavare, noto lo shift dell'angolo φ , la variazione dell'indice di rifrazione e quindi costante dielettrica ($\varepsilon = \eta^2$) del layer dielettrico. La risoluzione dell'equazione 4.4 è stata implementata con un semplice script matlab. In figura 4.2 riportiamo una simulazione effettuata, con i seguenti parametri:

- Indice di rifrazione dell'aria $\eta_d = 1$,
- Costante dielettrica del metallo del $\varepsilon = -17 - 0,7i$
- Lunghezza d'onda fascio incidente $\lambda = 635nm$
- Periodo del grating $\Lambda = 740nm$

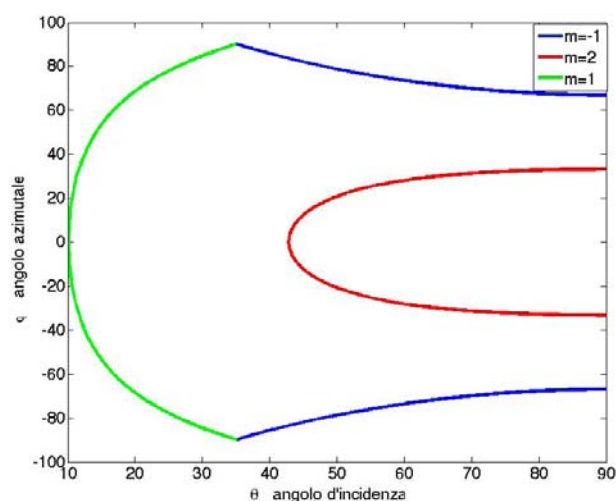


Figura 4.2: Coppie (φ, ϑ) per i diversi ordini di rifrazione, layer dielettrico costituito da aria

4.2 Rigorous Coupled Wave Analysis (RCWA)

Questo tipo di analisi è stato ampiamente utilizzato per la progettazione di strutture di diffrazione. Si tratta di una soluzione esatta delle equazioni di Maxwell nel caso di diffrazione elettromagnetica in dispositivi nanostrutturati (grating)[30]. Essa consiste in una tecnica deterministica non iterativa in cui la precisione della soluzione ottenuta dipende esclusivamente dal numero di termini conservati nelle espansioni armoniche dei campi. Inizialmente RCWA è stato sviluppato per lo studio di reticoli olografici, in seguito è stato esteso anche a superfici in rilievo e nanostrutture multilivello. È stato applicato con successo sia in trasmissione che in riflessione planare in molte configurazioni geometriche del reticolo tra le quali anche quella dei dispositivi utilizzati nel nostro laboratorio. Nella tecnica per analizzare la diffrazione nel caso di strutture grating quest'ultimo viene suddiviso in un elevato numero di sottili layer planari, in modo da approssimare con elevata accuratezza il profilo del reticolo stesso(vedi figura 4.4). I campi elettromagnetici per ogni layer vengono determinati attraverso l'approccio di accoppiamento dell'onda (coupled wave) che abbiamo visto nei capitoli precedenti. Le condizioni elettromagnetiche al contorno vengono applicate in sequenza tra le interfacce tra la zona d'uscita e i singoli strati del reticolo, e infine alla regione di ingresso per ottenere l'ampiezza dell'onda riflessa o trasmessa rifratta e l'efficienza della rifrazione nel reticolo. Nel paragrafo successivo andremo per prima cosa ad analizzare come si propagano le onde luminose in sistemi multistrato composti da layer aventi indice di rifrazione diverso.

4.2.1 Riflessione e trasmissione in sistemi multistrato

Si consideri la riflessione e la trasmissione di un'onda piana polarizzata in modalità TE che si propaga nello spazio con lunghezza d'onda λ_0 incidente con angolo ϑ su una pila di L strati uniformi aventi indice di rifrazione n_1, \dots, n_L e spessore d_1, \dots, d_L , come mostrato in figura 4.3. In seguito vedremo la gene-

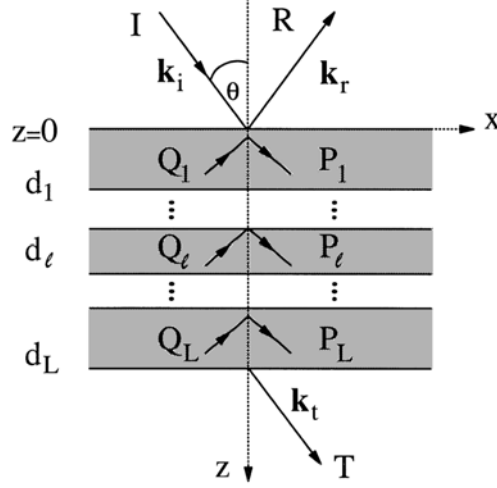


Figura 4.3: Geometria per la riflessione e la trasmissione per una pila di layers uniformi

ralizzazione nel caso di modalità TM. Il campo elettrico normalizzato (nella direzione y) per le regioni di ingresso e di uscita di ciascuno degli strati può essere scritto nel seguente modo:

$$\begin{aligned}
 E_0 &= [e^{-jk_{I,z}z} + Re^{jk_{I,z}z}]e^{-jk_x x} & z \leq 0 & \quad (4.5) \\
 E_l &= [P_l e^{-k_0 \gamma_l (z - D_{l-1})} + Q_l e^{k_0 \gamma_l (z - D_l)}]e^{-jk_x x} & D_{l-1} \leq z \leq D_l \\
 E_t &= T e^{-j[k_x x + k_{II,z}(z - D_L)]} & z \geq D_L
 \end{aligned}$$

$$k_x = k_0 n_I \sin \vartheta$$

$$k_{I,x} = k_0 n_I \cos \vartheta$$

$$k_{II,z} = k_0 \sqrt{n_{II}^2 - n_I^2 \sin^2 \vartheta}$$

$$\gamma_l = j \sqrt{n_l^2 - n_I^2 \sin^2 \vartheta} \quad l = 1, \dots, L$$

$$D_l = \sum_{p=1}^l d_p$$

Dove R e T sono le ampiezze riflesse e trasmesse dei campi elettrici, P e Q sono invece le ampiezze dei campi all'interno della singola lastra uniforme, $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ è la grandezza del vettore d'onda e, infine, n_I e n_{II} sono gli indici di rifrazione, rispettivamente, della regione d'ingresso e della regione d'uscita. Si noti che per una regione senza perdite γ_l è puramente immaginario quando $n_l > n_I \sin \vartheta$, invece è reale quando $n_l < N_i \sin \theta$ (riflessione interna totale, ad esempio nel caso di campi evanescenti nel dielettrico). Per una regione con perdite invece, si ha indice di rifrazione complesso γ_l . Si ottengono le ampiezze riflesse e trasmesse facendo corrispondere le componenti tangenziali dei campi elettrici e magnetici al confine tra layer adiacenti. Al bordo tra la regione di input e il primo layer ($z=0$) abbiamo:

$$1 + R = P_1 + Q_1 e^{-k_0 \gamma_1 d_1} \quad (4.6a)$$

$$j(k_{I,z}/k_0)(1 - R) = \gamma_1(P_1 - Q_1 e^{-k_0 \gamma_1 d_1}) \quad (4.6b)$$

All'interfaccia tra il layer $(l - 1)$ e il layer l ($z = D_{l-1}$) invece:

$$P_{l-1} e^{-k_0 \gamma_{l-1} d_{l-1}} + Q_{l-1} = P_l + Q_l e^{-k_0 \gamma_l d_l} \quad (4.7a)$$

$$\gamma_{l-1}[P_{l-1} e^{-k_0 \gamma_{l-1} d_{l-1}} - Q_{l-1}] = \gamma_l[P_l + Q_l e^{-k_0 \gamma_l d_l}] \quad (4.7b)$$

Mentre all'interfaccia con la regione di output ($z = D_L$)

$$P_L e^{-k_0 \gamma_L d_L} + Q_L = T \quad (4.8a)$$

$$\gamma_L[P_L e^{-k_0 \gamma_L d_L} - Q_L] = j(k_{II,z}/k_0)T \quad (4.8b)$$

Si noti che la corrispondenza tra campo elettrico e magnetico per ogni interfaccia produce due equazioni. Avremo quindi, per una struttura a L layer, $2(L + 1)$ equazioni da risolvere. L'intero sistema di equazioni può essere risolto contemporaneamente per R e T mediante tecniche standard per la soluzione di un sistema di equazioni (decomposizione LU o QR), senza instabilità numerica: qualsiasi sia il numero di strati, qualsiasi sia lo spessore o indice di rifrazione. La rappresentazione inesatta di questi numeri, a causa del valore positivo elevato di γ_d , è stata risolta normalizzando per $(z - D)$ il termine esponenziale in cui compare γ . Purtroppo, per un numero elevato di strati, l'intero sistema di equazioni può essere troppo grande per effettuare un calcolo numerico computazionalmente efficiente. Tuttavia questa tecnica può introdurre dell'instabilità numerica addizionale come vedremo in seguito. Solitamente le equazioni 4.6, 4.7 e 4.8 sono risolte tramite un approccio a matrice di trasmittanza per ridurre il numero di equazioni del sistema che

vengono risolte simultaneamente. Con l'approccio di matrice di trasmissanza, quindi, possiamo riscrivere la 4.8 per determinare le ampiezze P_L e Q_L in termini del coefficiente di trasmissione T .

$$\begin{bmatrix} P_L \\ Q_L \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{-k_0\gamma_L d_L} & 1 \\ \gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} & -\gamma_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 1 \\ j(k_{II,z}/k_0) \end{bmatrix} T \quad (4.9)$$

La quale sostituita nell'equazione 4.7:

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} P_{L-1} \\ Q_{L-1} \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} e^{-k_0\gamma_{L-1} d_{L-1}} & 1 \\ \gamma_{L-1} e^{-k_0\gamma_{L-1} d_{L-1}} & -\gamma_{L-1} \end{bmatrix}^{-1} \times \begin{bmatrix} 1 & e^{-k_0\gamma_L d_L} \\ \gamma_L & -\gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} \end{bmatrix} \\ &\times \begin{bmatrix} e^{-k_0\gamma_L d_L} & 1 \\ \gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} & -\gamma_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 1 \\ j(k_{II,z}/k_0) \end{bmatrix} T \end{aligned} \quad (4.10)$$

Ripetendo questa operazione per i restanti layer, otteniamo:

$$\begin{aligned} &\begin{bmatrix} 1 \\ j(k_{I,z}/k_0) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ -j(k_{I,z}/k_0) \end{bmatrix} R \\ &= \prod_{l=1}^L \begin{bmatrix} 1 & e^{-k_0\gamma_L d_L} \\ \gamma_L & -\gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} e^{-k_0\gamma_L d_L} & 1 \\ \gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} & -\gamma_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 1 \\ j(k_{II,z}/k_0) \end{bmatrix} T \end{aligned} \quad (4.11)$$

Si noti che l'equazione appena presentata richiede il calcolo di una matrice inversa per ogni strato. In ogni strato quindi, se la quantità $(\gamma_l d_l)$ è grande e positiva (supporti con perdite o onda evanescente) tutti gli elementi nella colonna di sinistra della matrice saranno praticamente uguali zero. Come sappiamo l'inversione di una matrice mal condizionata produce alcuni elementi che non possono essere rappresentati con una precisione numerica sufficiente, questo a causa della precisione finita nella rappresentazione dei calcolatori. La problematica appena illustrata introduce quindi instabilità numerica nelle soluzioni. Sebbene il problema di riflessione-trasmissione sia fondamentalmente stabile, l'approccio con la matrice di trasmissanza può produrre comunque errori per mezzi con perdita o riflessione totale. La formulazione per la modalità di polarizzazione TM è simile a quella delle equazioni viste in precedenza, nelle quali γ_l è sostituito con γ_l/n_l^2 (ad eccezione degli esponenziali), $k_{I,z}$ con $k_{I,z}/n_I^2$ e $k_{II,z}$ con $k_{II,z}/n_I^2$. Ora R e T sono le componenti del campo magnetico riflesse e trasmesse (normali al piano di incidenza nella direzione y). L'instabilità numerica osservata per la polarizzazione in modalità TE si riscontra anche nel caso di polarizzazione in modalità TM.

- **Enhanced Transmittance Approach** Per prevenire l'instabilità numerica associata all'inversione della matrice, consideriamo l'ultimo fattore dell'equazione 4.11:

$$\begin{aligned}
& \begin{bmatrix} 1 & e^{-k_0\gamma_L d_L} \\ \gamma_L & -\gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e^{-k_0\gamma_L d_L} & 1 \\ \gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} & -\gamma_L \end{bmatrix}^{-1} \times \begin{bmatrix} \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix} \\
= & \begin{bmatrix} 1 & e^{-k_0\gamma_L d_L} \\ \gamma_L & -\gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} e^{-k_0\gamma_L d_L} & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ \gamma_L & -\gamma_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix}
\end{aligned} \tag{4.12}$$

Dove $\mathbf{f}_{L+1} = 1$ e $\mathbf{g}_{L+1} = jk_{II,z}/k_0$. Si noti che la matrice da invertire, con possibili problemi numerici, è stata riscritta come il prodotto di due matrici. Nel prodotto la matrice sulla destra è stata invertita senza problemi di instabilità numerica, mentre il lato destro dell'equazione 4.12 si può riscrivere nel seguente modo:

$$\begin{bmatrix} 1 & e^{-k_0\gamma_L d_L} \\ \gamma_L & -\gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e^{-k_0\gamma_L d_L} & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}^{-1} \times \begin{bmatrix} \mathbf{a}_L \\ \mathbf{b}_L \end{bmatrix} T \tag{4.13}$$

Dove

$$\begin{bmatrix} \mathbf{a}_L \\ \mathbf{b}_L \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ \gamma_L & -\gamma_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix} \tag{4.14}$$

La matrice residuo da invertita risulta essere mal-condizionata quando l'elemento diagonale $e^{-k_0\gamma_L d_L}$ è molto piccolo. Ovviamente per una semplice matrice (2×2) possiamo eseguire l'inversione della matrice analiticamente. Tuttavia la matrice avrà comunque il problema dato dalla difficoltà di rappresentazione numerica. Questa imprecisione comporterà instabilità numerica nel calcolo delle ampiezze riflesse e trasmesse. Possiamo risolvere il problema effettuando la sostituzione $T = e^{-k_0\gamma_L d_L} T_L$, quest'ultimo fattore si riduce in:

$$\begin{aligned}
\begin{bmatrix} \mathbf{f}_L \\ \mathbf{g}_L \end{bmatrix} T_L &= \begin{bmatrix} 1 & e^{-k_0\gamma_L d_L} \\ \gamma_L & -\gamma_L e^{-k_0\gamma_L d_L} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} a_L \\ b_L e^{-k_0\gamma_L d_L} \end{bmatrix} T_L = \\
& \begin{bmatrix} a_L + b_L e^{-2k_0\gamma_L d_L} \\ \gamma_L [a_L - b_L e^{-2k_0\gamma_L d_L}] \end{bmatrix} T_L
\end{aligned} \tag{4.15}$$

Ripetendo il processo per gli altri layer otteniamo:

$$\begin{bmatrix} 1 \\ j(k_{I,z}/k_0) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ -j(k_{I,z}/k_0) \end{bmatrix} R = \begin{bmatrix} f_1 \\ g_1 \end{bmatrix} T_1 \tag{4.16}$$

Dove la relazione tra T e T_1 è data da:

$$T = e^{-k_0\gamma_L d_L} \dots e^{-k_0\gamma_1 d_1} T_1 \tag{4.17}$$

Questo approccio con matrice di trasmittanza migliorato è un metodo efficiente e numericamente stabile.

4.2.2 RCWA per dispositivi grating multilivello

Ipotizziamo di avere un'onda elettromagnetica polarizzata linearmente che incide obliquamente con angolo di incidenza arbitrario ϑ su un dielettrico multilivello o in rilievo, oppure su una superficie nanostrutturata. Il periodo del reticolo Λ è in genere formato da diverse regioni con indice di rifrattori diversi. Il reticolo è vincolato da due mezzi diversi aventi indici di rifrazione diversi n_I e n_{II} . Nella formulazione in seguito presentata, senza perdita di

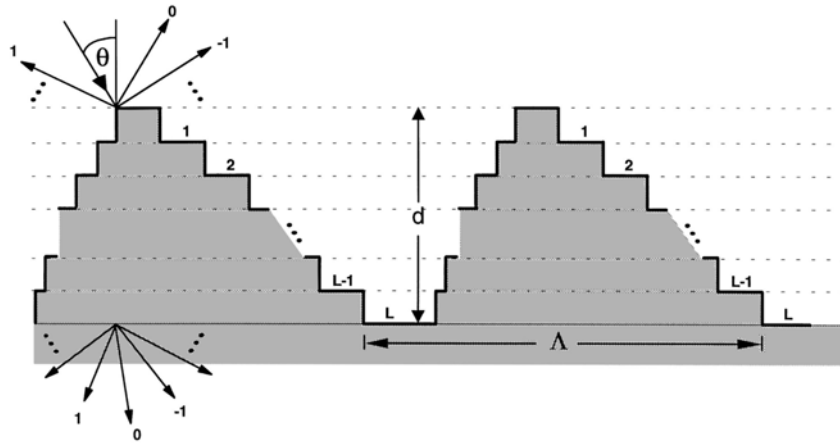


Figura 4.4: Suddivisione del reticolo di diffrazione in L layer

generalità si è posta la normale al contorno nella direzione z e il vettore del reticolo nella direzione x . Nella regione del reticolo la permittività periodica associabile è espandibile in Serie di Fourier:

$$\varepsilon(x, z) = \sum_h \varepsilon_h(z) e^{j(2\pi h/\Lambda)} \quad (4.18)$$

Dove $\varepsilon_h(z)$ è la h -esima componente di Fourier della permittività relativa nella regione del grating in funzione della sua profondità. Dividendo il reticolo in un gran numero di sottili layer perpendicolari alla normale al contorno (asse z), possiamo applicare il metodo RCWA sviluppato nel caso planare per ogni layer. Se i layer in cui abbiamo suddiviso il grating sono sufficientemente sottili, è possibile analizzarli con elevata precisione. Le componenti della serie di Fourier sono costanti all'interno di ogni sottile layer del grating. Avremo quindi che la permittività relativa periodica nel l -esimo layer di spessore d_l è data da:

$$\varepsilon_l(x) = \sum_h \varepsilon_{l,h}(z) e^{j(2\pi h/\Lambda)} \quad (4.19)$$

Con $D_l - d_l < z < D_l = \sum_{p=1}^l d_p$.

Il problema relativo al reticolo di rifrazione in rilievo è risolto in una sequenza di passi:

- 1 Si risolvono le equazione di accoppiamento dell'onda per ogni livello.
- 2 Si applicano le condizioni elettromagnetiche al contorno tra la zona di ingresso e il primo layer del reticolo, poi tra il primo e il secondo e così via fino a che non si raggiunge l'ultimo layer e la regione di uscita.
- 3 La matrice risultante dalle condizioni al contorno è risolta per l'ampiezza dei campi riflessi e trasmessi, e viene determinata l'efficienza della diffrazione.

In seguito andremo a vedere la formulazione in caso di polarizzazione TM, tralasciando la formulazione completa [31]

$$H_{I,y} = e^{-jk_0 n_0 [\sin(\theta)x + \cos(\theta)z]} + \sum_i R_i e^{-j(k_{x_i}x - k_{I,z_i}z)} \quad (4.20a)$$

$$H_{II,y} = \sum_i T_i e^{-j[k_{x_i}x + k_{II,z_i}(D_L - z)]} \quad (4.20b)$$

Dove R_i e T_i sono rispettivamente l'ampiezza normalizzata del campo magnetico dell' i -esima onda riflessa e dell' i -esima onda trasmessa

Le quantità k_{x_i} è determinata tramite le condizioni di Floquet:

$$k_{x_i} = k_0 [n_I \sin(\theta) - i(\lambda_0/\Lambda)] \quad (4.21a)$$

$$k_{l,z_i} = \sqrt{(k_0^2 n_l^2 - k_{x_i}^2)} \quad l = I, II \quad (4.21b)$$

Si noti che k_{i,z_i} e k_{II,z_i} sono positivi reali o negativi immaginari. Le efficienze di diffrazione sono definite nel seguente modo:

$$DE_{ri} = R_i R_i^* \Re[k_{0,z_i} / k_0 n_I \cos(\theta)] \quad (4.22a)$$

$$DE_{ti} = T_i T_i^* \frac{\Re\left(\frac{k_{II,2z_i}}{n_{II}^2}\right)}{\frac{k_0 \cos(\theta)}{n_I}} \quad (4.22b)$$

I campi magnetici e elettrici del l -esimo layer sono dunque espressi come espansione in Fourier nella seguente forma:

$$H_{l,gy} = \sum_i U_{l,y_i}(z) e^{-jk_{x_i}x} \quad (4.23a)$$

$$H_{l,gx} = j \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_0}} \sum_i S_{l,x_i}(z) e^{-jk_{x_i}x} \quad (4.23b)$$

Dove ε_0 e μ_0 sono rispettivamente la permittività e la permeabilità nel vuoto. $U_{l,y_i}(z)$ e $S_{l,x_i}(z)$ sono le ampiezze normalizzate del i -esimo campo

armonico spaziale, tale che i campo elettromagnetici soddisfino le equazioni di Maxwell nel layer del reticolo

$$\frac{\partial H_{l,gy}}{\partial z} = -j\omega\varepsilon_o\varepsilon_l(x)E_{l,gx} \quad (4.24a)$$

$$\frac{\partial E_{l,gx}}{\partial z} = -j\omega\mu_0 H_{l,gy} + \frac{\partial E_{l,gz}}{\partial x} \quad (4.24b)$$

Dove ω è la frequenza angolare dell'onda incidente. Sostituendo le espansioni di equazione 4.19 e 4.23 nelle equazioni di Maxwell otteniamo:

$$\frac{\partial^2 \mathbf{U}_{l,y}}{(z')^2} = \mathbf{E}_l \mathbf{B}_l \mathbf{U}_{l,y} \quad (4.25)$$

Dove \mathbf{B}_l può essere esplicitato:

$$\mathbf{B}_l = \mathbf{K}_x \mathbf{E}_l^{-1} \mathbf{K}_x - \mathbf{I} \quad (4.26)$$

Dove $z' = k_0 z$, \mathbf{I} è la matrice identità, \mathbf{K}_x è una matrice diagonale con sulla diagonale gli elementi \mathbf{k}_{x_i}/k_0 e \mathbf{E}_l è la matrice gli elementi con coordinate (i, p) corrispondono gli $\varepsilon_{l,i-p}$ definiti nell'equazione 4.19. Risolviamo le equazioni di accoppiamento delle onde (equazione 4.25) calcolando gli autovalori e gli autovettore associati alla matrice $(n \times n)$ $\mathbf{E}_l \mathbf{B}_l$ dove n è il numero di armoniche conservate nelle espansioni del campo. Il campo elettrico tangenziale è legato al magnetico tangenziale da:

$$\mathbf{S}_{l,x} = \mathbf{E}_l^{-1} \frac{\partial \mathbf{U}_{l,x}}{\partial z'} \quad (4.27)$$

Definiamo ora la matrice degli autovettori \mathbf{W}_l e la matrice $\mathbf{V}_l = \mathbf{E}_l^{-1} \mathbf{W}_l \mathbf{Q}_l$ dove \mathbf{Q}_l è matrice diagonale con gli elementi sulla diagonali costanti ma incogniti. Come nel caso del layer omogeneo si ottiene l'ampiezza del segnale riflesso e di quello trasmesso diffratto accoppiando il campo magnetico tangenziale alle condizioni al bordo tra i layer del grating. Al bordo tra la zona di ingresso e il primo strato del reticolo ($z = 0$) abbiamo

$$\begin{bmatrix} \delta_{i0} \\ j\delta_{i0} \cos(\theta)/n_I \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ -j\mathbf{Z}_I \end{bmatrix} \mathbf{R} = \begin{bmatrix} \mathbf{W}_1 & \mathbf{W}_1 \mathbf{X}_1 \\ \mathbf{V}_1 & \mathbf{V}_1 \mathbf{X}_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{c}_1^+ \\ \mathbf{c}_1^- \end{bmatrix} \quad (4.28)$$

Al bordo tra il layer del grating $l-1$ e l ($z = D_L$)

$$\begin{bmatrix} \mathbf{W}_{l-1} \mathbf{X}_{l-1} & \mathbf{W}_{l-1} \\ \mathbf{V}_{l-1} \mathbf{X}_{l-1} & -\mathbf{V}_{l-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{c}_{l-1}^+ \\ \mathbf{c}_{l-1}^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{W}_l & \mathbf{W}_l \mathbf{X}_l \\ \mathbf{V}_l & -\mathbf{V}_l \mathbf{X}_l \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{c}_l^+ \\ \mathbf{c}_l^- \end{bmatrix} \quad (4.29)$$

E infine il bordo tra l'ultimo layer e la regione di output ($z = D_L$) sarà:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L & \mathbf{W}_L \\ \mathbf{V}_L \mathbf{X}_L & -\mathbf{V}_L \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{c}_L^+ \\ \mathbf{c}_L^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{I}^+ \\ j\mathbf{Z}_{II}^- \end{bmatrix} \mathbf{T} \quad (4.30)$$

Dove Z_I e Z_{II} sono matrici diagonali con rispettivamente gli elementi $k_{I,z_i}/(n_I^2 k_0)$ e $k_{I,z_i}/(n_I^2 k_0)$ sulla diagonale e X_l è una matrice diagonale avente sulla diagonale gli elementi $e^{-q_{l,m} d_l}$. Le nanostrutture andrebbero quindi suddivise in L layer, il che implica la risoluzione di un sistema di $2n(L-1)$ equazioni, dove n è il numero di armoniche del campo conservate nella formulazione. Nell'approccio a forza bruta tutte le $2n(L-1)$ vengono risolte simultaneamente per R_i e T_i mediante tecniche standard per la risoluzione del problema (decomposizione QR). Con questo approccio non si incontreranno situazioni di instabilità qualsiasi sia numero di layer di qualsiasi sia lo spessore, o qualsiasi sia il numero di indici di rifrazione, anche per valori positivi elevati di γ_d . Però per un numero elevato di layer L il sistema di equazioni risulta essere troppo grande per essere risolto attraverso il calcolo numerico; devono quindi essere introdotti altri metodi che consentano di aumentare l'efficienza computazionale. Purtroppo questi metodi possono introdurre dell'instabilità numerica supplementare. Possiamo estendere l'approccio della matrice di trasmissione utilizzato anche nei sistemi a strati uniformi planari. Naturalmente questa estensione sarà accompagnata da una instabilità numerica che andremo a trattare nei paragrafi successivi. Tale instabilità viene accentuata dal fatto che gli autovalori associati all'equazione di accoppiamento dell'onda sono complessi con parte reale positivi. Inoltre il valore numerico degli autovalori aumenterà con il numero di armoniche dello spazio che verranno conservate nell'espansione. Avremo quindi che, per un reticolo in cui viene mantenuto un numero elevato di armoniche, la probabilità di instabilità delle soluzioni aumenta. Seguendo la procedura per la riflessione o trasmissione in una pila di layer uniformi possiamo riscrivere le equazioni 4.28, 4.29, 4.30:

$$\begin{bmatrix} \delta_{i0} \\ j\delta_{i0} \cos(\theta)/n_I \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ -j\mathbf{Z}_I \end{bmatrix} \mathbf{R} = \prod_{l=1}^L \begin{bmatrix} \mathbf{W}_l & \mathbf{W}_l \mathbf{X}_l \\ \mathbf{V}_l & -\mathbf{V}_l \mathbf{X}_l \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{W}_l \mathbf{X}_l & \mathbf{W}_l \\ \mathbf{V}_l \mathbf{X}_l & -\mathbf{V}_l \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ j\mathbf{Z}_{II} \end{bmatrix} \mathbf{T} \quad (4.31)$$

Abbiamo quindi che per ogni layer della nanostruttura è necessario calcolare una matrice inversa. Inoltre, se $y_{l,m} d_l$ assume valori elevati reali positivi, abbiamo che gli esponenziali associati $e^{-q_{l,m} d_l}$ presenti nella matrice diagonale X_l sono molto piccoli e probabilmente assimilabili a zero. Di conseguenza tutti gli elementi in una o più colonne saranno virtualmente zero. L'inversione di questa matrice quasi singolare non sarà quindi possibile o produrrà risultati errati a causa degli errori di troncamento. Anche nel caso in cui la matrice possa essere analiticamente invertita, alcuni elementi non potranno essere rappresentati con sufficiente precisione a causa del troncamento nella rappresentazione numerica a precisione finita, questa si traduce in instabilità numerica della soluzione. Un'idea per non incorrere nell'instabilità numerica può essere quella di aumentare il numero di strati, in questo modo riducendo la grandezza dell'esponente di $e^{-q_{l,m} d_l}$ abbiamo una migliore accuratezza. Tuttavia, devono essere utilizzati dei layer molto sottili (questo

implica numero molto elevato di layers) perché alcuni dei loro autovalori saranno comunque elevati se viene mantenuto un numero relativamente alto di armoniche spaziali.

In seguito verranno presentati due approcci numericamente stabili. Il primo prevede il calcolo di tutte le ampiezze di diffrazione riflesse e trasmesse. Il secondo approccio invece consente invece di calcolare solamente l'ampiezza di diffrazione riflessa o trasmessa. Questo secondo approccio, più semplice ed efficiente, è quello più idoneo per l'analisi di reticoli con struttura prevalentemente riflessiva o trasmissiva.

- **Full Solution Approach** Questo approccio numericamente stabile permette di calcolare tutte le ampiezze trasmesse e riflesse. L'approccio per anticipare l'instabilità introdotta dall'inversione della matrice applicata al layer $l = L$ è il seguente

$$\begin{aligned} & \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L & \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L \\ \mathbf{V}_L & -\mathbf{V}_L \mathbf{X}_L \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L & \mathbf{W}_L \\ \mathbf{V}_L \mathbf{X}_L & -\mathbf{V}_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix} \mathbf{T} = \\ & \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L & \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L \\ \mathbf{V}_L & -\mathbf{V}_L \mathbf{X}_L \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{X}_L & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L & \mathbf{W}_L \\ \mathbf{V}_L & -\mathbf{V}_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix} \mathbf{T} \end{aligned} \quad (4.32)$$

Dove $\mathbf{f}_{L+1} = \mathbf{I}$ e $\mathbf{g}_{L+1} = j\mathbf{Z}_{II}$. La matrice da invertire è stata riscritta come il prodotto di due matrici. La matrice di destra è ben-condizionata, e la sua inversione è numericamente stabile. Tuttavia è consigliabile utilizzare la decomposizione ai valori singolari SVD, se si ipotizza che alcuni autovalori e autovettori siano numericamente degeneri. La parte destra della 4.32 può quindi essere riscritta:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{W}_L & \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L \\ \mathbf{V}_L & -\mathbf{V}_L \mathbf{X}_L \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{X}_L & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{a}_L \\ \mathbf{a}_L \end{bmatrix} \mathbf{T} \quad (4.33)$$

Dove

$$\begin{bmatrix} \mathbf{a}_L \\ \mathbf{a}_L \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L & \mathbf{W}_L \\ \mathbf{V}_L & -\mathbf{V}_L \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix} \quad (4.34)$$

Come nel caso dei multistrati di layer uniformi, la matrice da invertire restante è mal-condizionata quando gli elementi della diagonale di \mathbf{X}_L sono molto piccoli. Chiaramente per questa matrice diagonale possiamo eseguire l'inversione analiticamente, per ottenere la matrice invertita con precisione. Tuttavia, per quanto detto in precedenza, gli elementi sulla diagonale non possono essere rappresentati con precisione numerica sufficiente a causa della precisione finita e degli errori di troncamento. Ovviando a questo problema introducendo la seguente sostituzione $\mathbf{T} = \mathbf{a}_L^{-1} \mathbf{X}_L \mathbf{T}_L$ l'equazione 4.31 diventa:

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} \mathbf{f}_L \\ \mathbf{g}_L \end{bmatrix} \mathbf{T} &= \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L & \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L \\ \mathbf{V}_L & -\mathbf{V}_L \mathbf{X}_L \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ \mathbf{b}_L \mathbf{a}_L^{-1} \mathbf{X}_L \end{bmatrix} \mathbf{T}_L \\ &= \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L (\mathbf{I} + \mathbf{X}_L \mathbf{b}_L \mathbf{a}_L^{-1} \mathbf{X}_L) \\ \mathbf{V}_L (\mathbf{I} + \mathbf{X}_L \mathbf{b}_L \mathbf{a}_L^{-1} \mathbf{X}_L) \end{bmatrix} \mathbf{T}_L \end{aligned} \quad (4.35)$$

Ripetendo il passaggio per tutti i layer otteniamo un'equazione nella seguente forma

$$\begin{bmatrix} \delta_{i0} \\ j\delta_{i0} \cos(\theta)/n_I \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ -j\mathbf{Z}_I \end{bmatrix} \mathbf{R} = \begin{bmatrix} \mathbf{f}_1 \\ \mathbf{g}_1 \end{bmatrix} \mathbf{T}_1 \quad (4.36)$$

Dove:

$$\mathbf{T} = \mathbf{a}_L^{-1} \mathbf{X}_L \cdots \mathbf{a}_l^{-1} \mathbf{X}_l \cdots \mathbf{a}_1^{-1} \mathbf{X}_1 \mathbf{T}_1 \quad (4.37)$$

I parametri $\mathbf{a}_l \mathbf{b}_l \mathbf{f}_l \mathbf{g}_l$ si ottengono con un procedimento analogo a quello delle espressioni 4.33 e 4.34. L'equazione 4.36 è facilmente risolvibile per \mathbf{R}_i e \mathbf{T}_i senza introdurre instabilità numerica per qualsiasi numero di layer.

- **Partial Solution Approach** Andiamo ora ad analizzare un metodo che risulta essere computazionalmente molto più efficace pur mantenendo la stabilità delle soluzioni sia per l'ampiezza diffratta riflessa sia per l'ampiezza diffratta trasmessa. L'espressione che andremo a vedere in seguito è applicata al calcolo delle ampiezze riflesse. L'equazione 4.30 al bordo $L + 1$ può essere riscritta nel seguente modo:

$$\begin{bmatrix} -\mathbf{W}_L & \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{V}_L & \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{c}_{L+1}^- \\ \mathbf{c}_{L+1}^+ \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L \\ \mathbf{V}_L \mathbf{X}_L \end{bmatrix} \mathbf{C}_L^+ \quad (4.38)$$

Dove $\mathbf{C}_{L+1}^+ \equiv \mathbf{T}$, $\mathbf{f}_{L+1} \equiv \mathbf{I}$ e $\mathbf{g}_{L+1} = j\mathbf{Z}_{II}$. Dall'equazione 4.38 la relazione tra \mathbf{C}_L^+ e \mathbf{C}_L^- è data da:

$$\mathbf{C}_L^- = \mathbf{a}_L \mathbf{C}_L^+ \quad (4.39)$$

Dove:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{a}_L \\ \mathbf{b}_L \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\mathbf{W}_L & \mathbf{f}_{L+1} \\ \mathbf{V}_L & \mathbf{g}_{L+1} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{W}_L \mathbf{X}_L \\ \mathbf{V}_L \mathbf{X}_L \end{bmatrix} \quad (4.40)$$

L'inversione della matrice è numericamente stabile in quanto la matrice è ben-condizionata. La matrice \mathbf{b}_l non viene utilizzata. Da quest'ultima equazione il campo appena dentro lo strato $L - 1$ al bordo $l = L$ è dato da:

$$\begin{bmatrix} -\mathbf{W}_{L-1} & \mathbf{f}_L \\ \mathbf{V}_{L-1} & \mathbf{g}_L \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{c}_{L-1}^- \\ \mathbf{c}_L^+ \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{W}_{L-1} & \mathbf{X}_{L-1} \\ \mathbf{V}_{L-1} & \mathbf{X}_{L-1} \end{bmatrix} \mathbf{c}_{L-1}^+ \quad (4.41)$$

Ripetendo il procedimento della 4.39 e 4.41 per i rimanenti layer otteniamo:

$$\begin{bmatrix} \delta_{i0} \\ j\delta_{i0} \cos(\theta)/n_I \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ -j\mathbf{Z}_I \end{bmatrix} \mathbf{R} = \begin{bmatrix} \mathbf{f}_1 \\ \mathbf{g}_1 \end{bmatrix} \mathbf{C}_1^+ \quad (4.42)$$

Dove le quantità f_1 e g_1 sono definite in precedenza. L'equazione 4.42 è facilmente risolvibile per R_i senza problemi di stabilità numerica. Questo approccio molto più semplice e efficiente rispetto al Full Solution Approach, permette di ottenere la soluzione con meno della metà delle moltiplicazioni per matrice. Inoltre viene eseguita una sola inversione di una matrice ($2n \times 2n$), che risulta essere anche un'inversione efficiente visto che è richiesto di invertire solo la parte superiore della matrice. Tuttavia con le equazioni precedenti si ottengono solamente le ampiezze riflesse. La formulazione invece per le ampiezze trasmesse, per cui il processo di accoppiamento del fascio luminoso inizia sul lato di ingresso con la propagazione dei campi verso il substrato, è molto simile.

4.2.3 Risultati della simulazione

Il software utilizzato per la simulazione, sviluppato in precedenza dal gruppo di ricerca del *laboratorio BioDevices del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione*, implementa la tecnica *Full Solution Approach*. Questo metodo, come spiegato nel paragrafo precedente, ci consente di calcolare simultaneamente tutte le ampiezze riflesse e trasmesse. Nella nostra simulazione andremo a simulare il comportamento del dispositivo in trasmissione. Rispetto al grafico 4.2 ottenuto con il modello vettoriale, in questo caso, nota la struttura del grating (figura 4.5), possiamo anche ottenere le ampiezze del segnale riflesso e trasmesso. Diventa quindi fondamentale, per prima cosa, descrivere la geometria del grating che andremo a simulare. Definiamo in modo particolare le altezze dei layer metallici:

- $h_1 = 20nm$ spessore del layer metallico di input
- $h_2 = 35nm$ spessore del layer metallico intermedio
- $h_3 = 20nm$ spessore del layer metallico di output che si interfaccia con il supporto in policarbonato

I rimanenti parametri, analoghi a quelli utilizzati nella simulazione con modello vettoriale, sono riportati in figura 4.5.

Utilizziamo ora il software a disposizione, con i parametri assunti in precedenza, per simulare il comportamento del segnale trasmesso per alcuni angoli di incidenza ϑ_i fissati nell'intervallo $[12, 15]^\circ$. Come possiamo vedere in figura 4.6 al variare dell'angolo d'incidenza ϑ_i l'angolo azimutale φ di accoppiamento plasmonico varia. In particolare all'aumentare dell'angolo

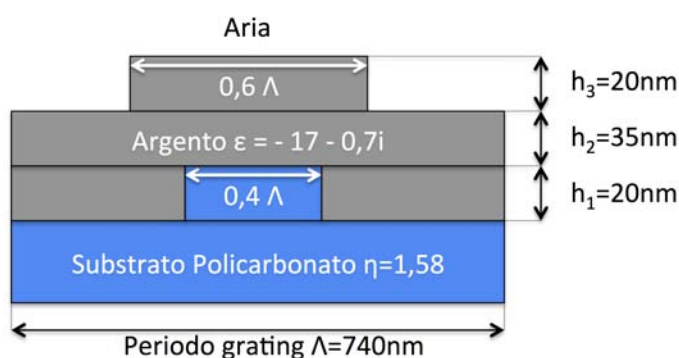
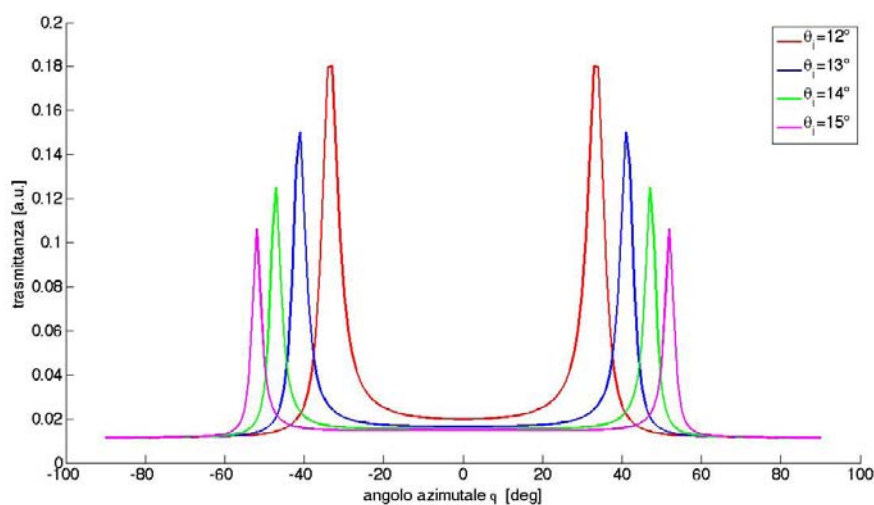


Figura 4.5: Geometria semplificata del grating simulato

di incidenza ϑ_i i picchi si allargano e quindi l'angolo φ al quale si verifica l'accoppiamento plasmonico aumenta. La trasmittanza in corrispondenza dei picchi e il valore della baseline diminuiscono notevolmente all'aumentare dell'angolo di incidenza. Quanto abbiamo appena osservato coincide con il comportamento simulato con il modello vettoriale (figura 4.2).

Figura 4.6: Andamento della trasmittanza al variare dell'angolo d'incidenza ϑ_i ottenuta con simulatore RCWA

Tra i parametri che possiamo variare c'è l'indice di rifrazione del layer superiore. Questo nel caso di dispositivo non funzionalizzato (fresh) corrisponde all'indice di rifrazione dell'aria ($\eta_d = 1$), e varia a seconda del tipo, della concentrazione e della tecnica di deposizione delle molecole che funzionalizzano la superficie di riferimento del sensore. Andiamo a vedere in figura 4.7 come si comporta la trasmittanza al variare dell'indice di rifra-

zione del layer dielettrico. All'aumentare dell'indice di rifrazione i picchi si

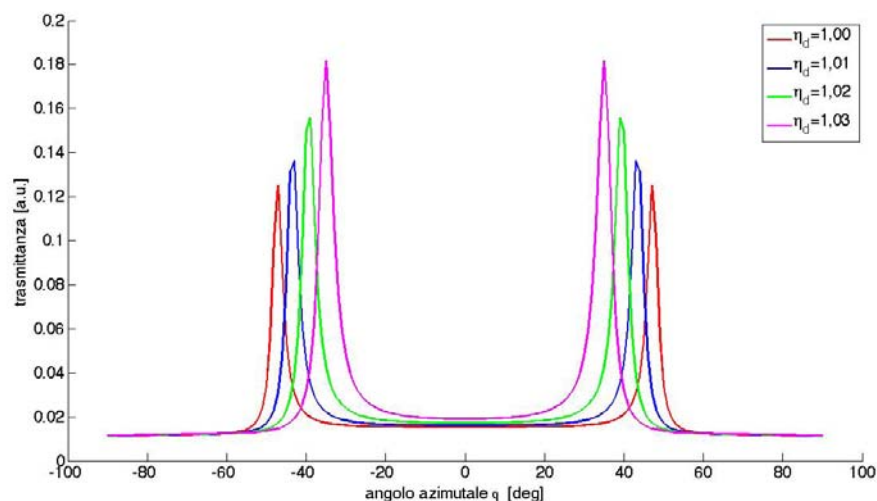


Figura 4.7:

stringono e la trasmittanza in corrispondenza aumenta, incrementa anche il valore della baseline. Un'interpretazione semplice, che può essere data all'aumento dell'indice di rifrazione del dielettrico, è quella di un incremento dello spessore del layer delle molecole deposte sulla superficie del sensore stesso, vedremo nel paragrafo successivo la trattazione approfondita di questo fenomeno. Questo tipo di simulazioni saranno utili in seguito quando andremo a valutare la funzionalizzazione dei dispositivi a diverse concentrazioni.

Proviamo ora a simulare il comportamento dell'accoppiamento plasmonico in un intervallo di angoli di incidenza ϑ_i compreso tra $[0, 90]^\circ$. In figura 4.8 abbiamo visualizzato l'andamento della trasmittanza, rappresentata in scala cromatica, in funzione della coppia (φ, ϑ) . Ricordiamo che, nel setup di misura utilizzato, all'accoppiamento plasmonico corrisponde un massimo di corrente del segnale trasmesso. Possiamo quindi individuare la posizione delle coppie (φ, ϑ) alle quali si verifica l'accoppiamento plasmonico osservando semplicemente l'ampiezza della trasmittanza. Si è provato a questo punto a confrontare gli andamenti ottenuti con il modello d'onda vettoriale, sovrapponendo i due grafici, come possiamo vedere in figura 4.9. Il confronto tra i due grafici ci porta a dire che le coppie (φ, ϑ) restituite dai due metodi sono molto simili. Quindi, nonostante la sua semplicità, il modello vettoriale è ottimale nel caso in cui siamo interessati a ricavare solamente l'angolo di accoppiamento azimutale noto l'angolo di incidenza.

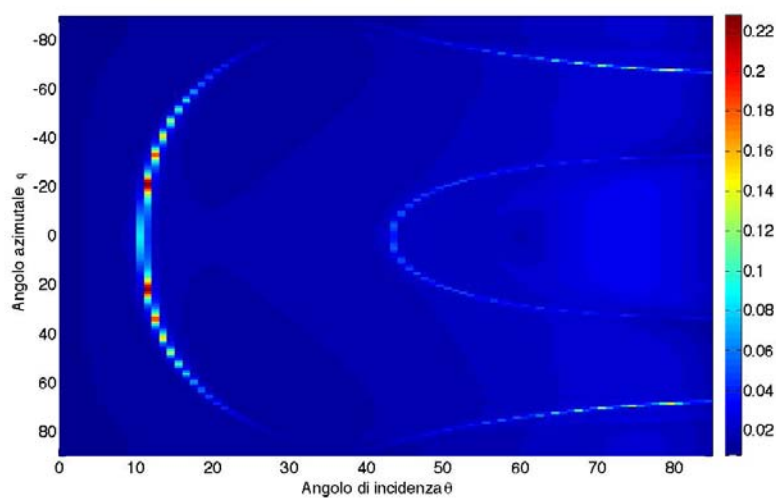


Figura 4.8: Coppie (φ, ϑ) per i diversi ordini di rifrazione, layer dielettrico costituito da aria

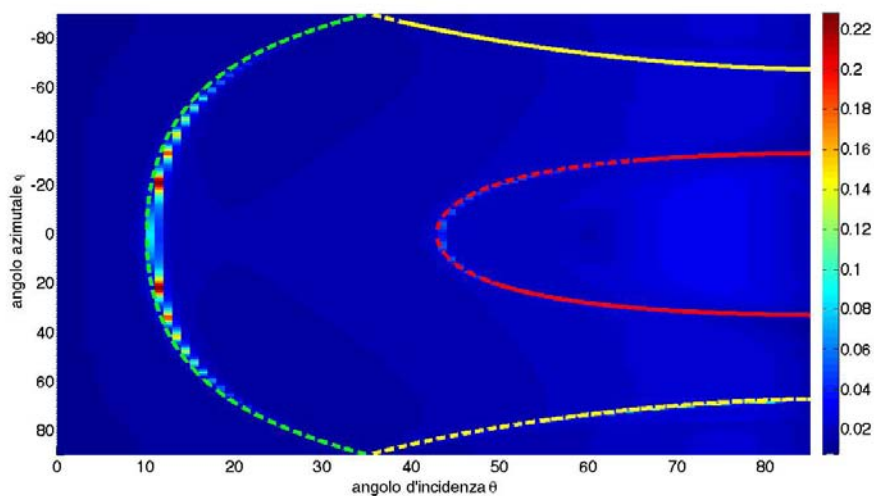


Figura 4.9: Confronto tra simulazioni ottenute con metodo RCWA (*scala cromatica*) e Modello d'onda vettoriale (*linee tratteggiate*) per gli ordini di rifrazione $m = \pm 1, +2$

4.3 Modifiche alla superficie attiva del sensore e variazione dell'indice di rifrazione

Supponiamo che la superficie attiva del nostro biosensore sia funzionalizzata con delle molecole di cui ignoriamo le proprietà specifiche. Se proviamo a

variare lo spessore del layer dielettrico formato da queste molecole osserviamo immediatamente una variazione della posizione del picco in riflessione. In particolare avremo uno shift verso un angolo φ di SPR inferiore. Lo shift risulta essere proporzionale allo spessore del layer:

$$\Delta\varphi = n \cdot d_2 \quad (4.43)$$

quindi:

$$n = \frac{\Delta\varphi}{d_2} \quad (4.44)$$

Dove n dipende quasi linearmente dall'indice di rifrazione del mezzo. Il motivo per cui si verifica lo shift è dovuto al fatto che l'indice di rifrazione effettivo del dielettrico include oltre agli effetti dell'aria, presenti anche nella condizione fresh, gli effetti dovuti alle molecole adsorbite sulla superficie attiva. Possiamo quindi assimilare il sistema aria/molecole adsorbite ad un unico mezzo dielettrico uniforme avente indice di rifrazione effettivo η_{eff} . Questa approssimazione è soddisfacente quando le variazioni locali della permittività sono molto inferiori rispetto alla lunghezza d'onda della luce nel mezzo. Avremo quindi che la propagazione degli SPP trova mezzo dielettrico con indice di rifrazione effettivo:

$$\eta_{eff} = \frac{2}{L} \left(\int_0^{d_2} dz \eta_a e^{-\frac{2z}{L}} + \int_{d_2}^{\infty} dz \eta_s e^{-\frac{2z}{L}} \right) \quad (4.45)$$

Questa approssimazione è nota come Effective Medium Approximation (EMA) [32], dove η_a è l'indice di rifrazione del layer di molecole adsorbite, mentre η_s è la costante dielettrica dell'aria e L è l'estensione spaziale dei plasmoni di superficie che abbiamo ricavato in precedenza nell'equazione 2.53. Risolvendo la 4.45 per ogni spessore del layer di molecole,

$$\eta_{eff} = \eta_a(1 - e^{-2\frac{d}{L}}) + \eta_s e^{-2\frac{d}{L}} = \eta_s + (\eta_a + \eta_s)(1 - e^{-2\frac{d}{L}}) \quad (4.46)$$

supponendo che $\frac{d_2}{L} \ll 1$ la 4.46 si semplifica:

$$\eta_{eff} = \eta_0 + \frac{2d_2}{L}(\eta_1 - \eta_0) \quad (4.47)$$

Dalla quale possiamo ricavare l'estensione spaziale dei plasmoni L per un ipotetico $\Delta\varepsilon_{eff}$ derivato dal $\Delta\vartheta$ che abbiamo ottenuto dalla variazione dello spessore del layer di molecole che abbiamo simulato:

$$L = 2 \frac{\Delta d_2}{\Delta\varepsilon_{eff}} (\varepsilon_2 - \varepsilon_{II}) \quad (4.48)$$

L risulta essere pari a $680nm$. Di conseguenza espandendo in serie di Taylor la 4.46 otteniamo la seguente semplice espressione della variazione dell'indice

di rifrazione efficaci in funzione dello spessore del layer molecolare adsorbito sulla superficie attiva:

$$\Delta\eta_{eff} = \frac{2d_2 \varepsilon_2 - \varepsilon_{II}}{L \eta_{II}} \quad (4.49)$$

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto viene riportato in letteratura[riferimento]. Ora che abbiamo calcolato $\Delta\eta_{eff}$ possiamo definire secondo la definizione 3.8 la sensibilità S_{RI} dell'indice di rifrazione del nostro sistema come:

$$S_{RI} = \frac{\Delta\varphi}{\Delta\eta_{eff}} \quad (4.50)$$

In questo modo potremo calcolare la sensibilità dell'indice di rifrazione in funzione della variazione dell'angolo azimutale di SPR $\Delta\varphi$.

Andiamo a simulare il comportamento dell'accoppiamento plasmonico al variare dell'indice di rifrazione efficace η_{eff} per diversi angoli di incidenza ϑ . In figura 4.10 possiamo vedere come al diminuire dell'angolo di incidenza

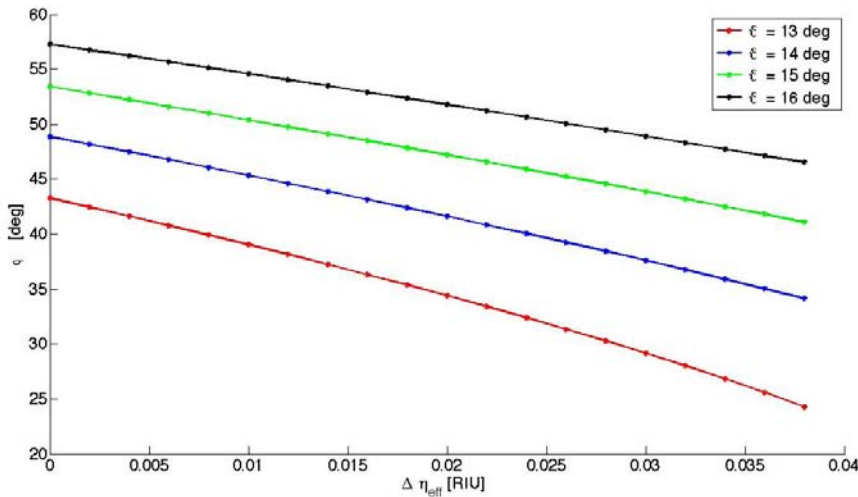


Figura 4.10: Andamento dell'angolo azimutale φ in funzione della variazione dell'indice effettivo del layer dielettrico η_{eff} . Simulazione effettuata per diversi angoli di incidenza del fascio di eccitazione ϑ

del fascio luminoso ϑ la variazione dell'angolo φ di SPR, rispetto alla condizione del dispositivo non funzionalizzato ($\Delta\eta_{eff} = 0$), sia maggiore. Avremo quindi che la variazione rispetto alla condizione del dispositivo non funzionalizzato aumenterà al diminuire dell'angolo di incidenza. Anche se sembra vantaggioso ai fini della rilevazione delle modifiche alla superficie, occorre fare attenzione nel ridurre l'angolo d'incidenza; si rischia infatti che nella condizione di dispositivo funzionalizzato i due picchi non siano più distinguibili perché troppo vicini. Osserviamo ora il grafico relativo all'andamento della

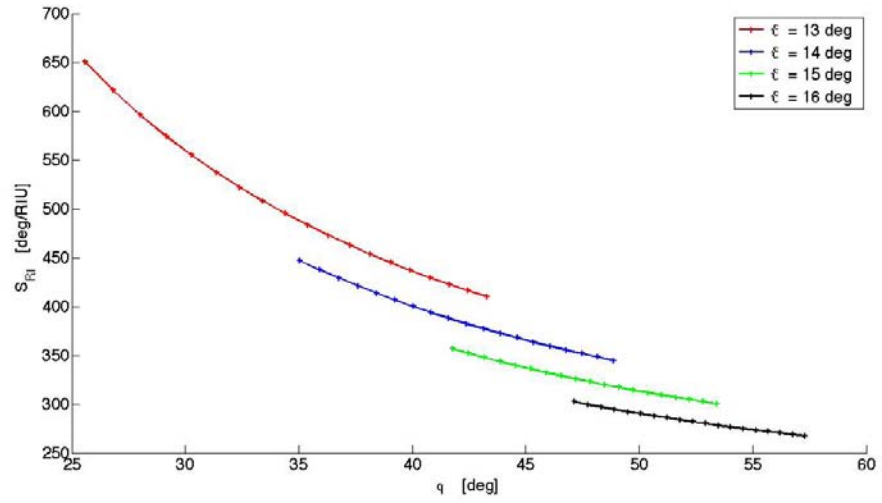


Figura 4.11: Andamento della sensibilità dell'indice di rifrazione S_{RI} al variare dell'angolo azimutale di accoppiamento φ . Simulazione effettuata per diversi angoli di incidenza del fascio di eccitazione ϑ

sensibilità in funzione dell'angolo di SPR φ (figura 4.11). Possiamo vedere come al diminuire dell'angolo di incidenza del fascio luminoso ϑ la sensibilità massima aumenti. Questo è dovuto al fatto che, come detto in precedenza la variazione dell'indice di rifrazione $\Delta\eta_{eff}$ comporta uno $\Delta\varphi$ maggiore in corrispondenza di angoli di incidenza minori. Teoricamente quindi per $\varphi \rightarrow 0$ avremo una sensibilità $S_{RI} \rightarrow \infty$, questa condizione risulta essere comunque problematica perché i picchi come detto in precedenza risulterebbero molto vicini e quindi difficili da distinguere. Andremo quindi ad utilizzare nel setup del banco di misura l'angolo di incidenza ϑ simulato più piccolo, in modo da poter effettuare le misure con una buona sensibilità.

Capitolo 5

Materiali e Metodi

A differenza dei molti banchi di misura visti in letteratura, il banco che andiamo ad utilizzare effettua misure in trasmissione e non in riflessione. La trattazione vista in precedenza, per lo più in modalità di riflessione, resta comunque di notevole importanza; visto che tutta la formulazione sviluppata vale in maniera complementare per la modalità di trasmissione. Andremo quindi a misurare l'ampiezza del segnale diffratto trasmesso.

I dispositivi utilizzati per ottenere l'accoppiamento plasmonico tramite l'utilizzo del banco in trasmissione sono nano-strutturati. Essi sono stati forniti da Next Step Engineering s.r.l., uno spin off dell'Università di Padova, e sono costituiti da un substrato in policarbonato sul quale è impressa la nano-struttura che consiste in un grating unidimensionale. Un sottile layer d'argento, dello spessore di circa 55 nm (Densità Ottica 2200), è depositato sul substrato in policarbonato in modo da poter eccitare i plasmoni di superficie all'interfaccia argento/aria. La struttura così creata ha un periodo di 740 nm e l'ampiezza del grating risulta essere 20 nm.

La risonanza plasmonica viene ottenuta illuminando il grating con un laser polarizzato in modalità Transversale Magnetica (TM) di lunghezza d'onda 635 nm. Il laser illumina direttamente la superficie in argento, eccitando i plasmoni all'interfaccia metallo/aria. Questa interfaccia è costituita solamente da metallo a contatto con l'aria nel caso in cui il dispositivo sia nella condizione fresh, mentre, nel caso di dispositivo funzionalizzato, è costituita da un layer di PEG depositato sulla superficie metallica. La condizione di eccitazione plasmonica avviene per determinate coppie di angolo di incidenza ϑ e angolo azimutale φ . L'angolo ϑ rappresenta l'inclinazione del fascio rispetto al piano definito dal grating mentre l'angolo azimutale φ rappresenta l'orientazione della nano-struttura rispetto al piano di incidenza della luce. Le coppie (ϑ, φ) dove avviene l'eccitazione plasmonica, dipendono dalla condizione della superficie metallo/aria la quale varia a seconda si tratti di dispositivo fresh o funzionalizzato. La misura tipica viene effettuata acquisendo la trasmittanza del grating in funzione dell'angolo azimutale φ , per un

fissato angolo di incidenza ϑ . Un picco in trasmittanza viene rilevato per un certo angolo azimutale φ e corrisponde alla condizione di risonanza plasmonica. Lo spostamento del picco di trasmittanza può essere messo in relazione con la variazione delle condizioni di risonanza plasmonica e quindi con la condizione della superficie metallo/aria come vedremo in seguito.

5.1 Set-up del banco

Tutte le misure riportate in seguito sono state effettuate con il set-up del banco riportato in figura:

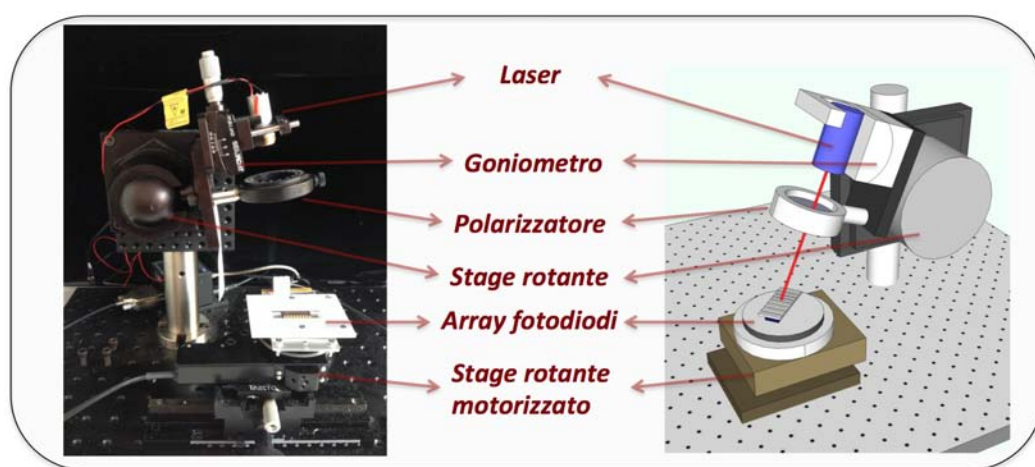


Figura 5.1: Rappresentazione schematica del banco di misura

5.1.1 Componenti del banco

- **Sorgente Laser:** *Edmund VHKTM Circular Beam Visible Laser Modules*, fissato a due manipolatori Thorlabs che permettono di variare l'angolo di incidenza ϑ del fascio luminoso. Il manipolatore principa-



Figura 5.2: *Edmund VHKTM Circular Beam Visible Laser Modules*

le è ancorato alla base del banco e permette di fissare l'angolo ϑ con



Figura 5.3: Goniometro *Thorlabs*© *GNL18/M*

una risoluzione di 2° . Per una regolazione più precisa dell'angolo di incidenza la sorgente laser è stata fissata su un goniometro *Thorlabs*© *GNL18/M* avente risoluzione di $10'$ di grado e consente variazioni di $\pm 5^\circ$ nell'intorno dell'angolo ϑ fissato dal manipolatore principale

- **Polarizzatore:** Consente di polarizzare in modalità TM, regolato in modo che i picchi risultino simmetrici.
- **Rilevatore:** *Hamamatsu S4111-16R* (figura 5.4), si tratta di un array lineare di fotodiodi costituito da 16 elementi montato in un DIP ceramico.

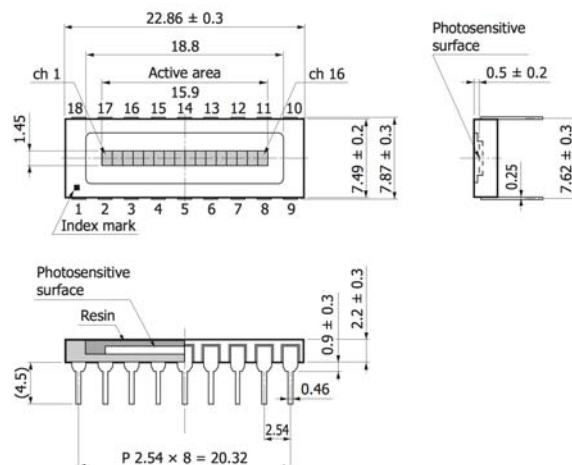


Figura 5.4: Struttura geometrica *Hamamatsu*© *S4111-16R*

Questo array di fotodiodi è sviluppato principalmente per il rilevamento di livelli medio-bassi di illuminazione (ad esempio la spettrofotometria). Copre una gamma spettrale che va dall'UV alla prossimità dell'infrarosso. Tutti gli elementi dell'array possono essere singolarmente polarizzati inversamente, questo ci consente di ottenere informazioni indipendenti da ogni singolo elemento. Nella nostra applicazione i 16 elementi sono collegati in parallelo, visto che siamo interessati a conoscere solamente il valore della trasmittanza senza distinguere quali siano gli elementi eccitati. In figura 5.5 è possibile vedere lo schema a blocchi relativo alla parte di misura elettronica del banco. L'array di fotodiodi è collegato direttamente all'analizzatore HP4156B. Per le misure che andremo ad effettuare l'analizzatore può essere pensato semplicemente come un generatore di tensione, che polarizza inversamente l'array di fotodiodi con elementi collegati in parallelo, in serie ad un amperometro, che avrà lo scopo di misurare la corrente di trasmittanza.

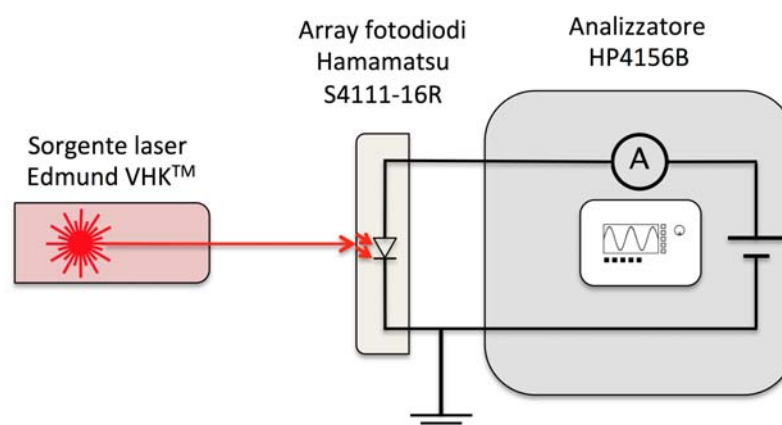


Figura 5.5: Schema a blocchi della parte elettronica del banco

- **Stage rotativo:** Thorlabs© PRM1Z8. La configurazione di accoppiamento che andremo ad utilizzare necessita di poter variare l'angolo di orientazione della nano-struttura rispetto al piano di incidenza del fascio luminoso, ossia l'angolo azimutale φ . Per questo è fondamentale l'utilizzo di uno stage rotativo motorizzato (Thorlabs© PRM1Z8) che collegato ad una unità di controllo (DC Servo Motor Driver TDC001) permette di controllare da terminale la posizione (angolo φ) e coordinare gli spostamenti angolari con le acquisizioni effettuate dell'analizzatore.

Nel capitolo successivo, analizzeremo in maniera più approfondita la sincronizzazione tra acquisizione e spostamento dello stage rotativo.



Figura 5.6: Stage rotativo (*Thorlabs*® *PRM1Z8*) e unità di controllo (*DC Servo Motor Driver TDC001*)

5.1.2 Caratteristiche dei dispositivi

I dispositivi nanostrutturati utilizzati per tutte le prove sperimentali hanno un periodo di reticolo $\Lambda = 740 \text{ nm}$, un *duty cycle* (DC) dello strato d'argento pari a 0,6 con densità ottica 2200 e un DC dello strato di policarbonato pari a 0,4 (figura 4.5). In figura 5.7 possiamo vedere un'immagine del reticolo acquisita presso il Centro Universitario Grandi Apparecchiature Scientifiche (C.U.G.A.S.) dell'Università di Padova, con microscopio a scansione (*SAM*), mentre in figura 5.8 è riportata un'acquisizione ottenuta con microscopio a forza atomica (*AFM*). I dispositivi sono stati forniti da *Next Step Engineering s.r.l.*

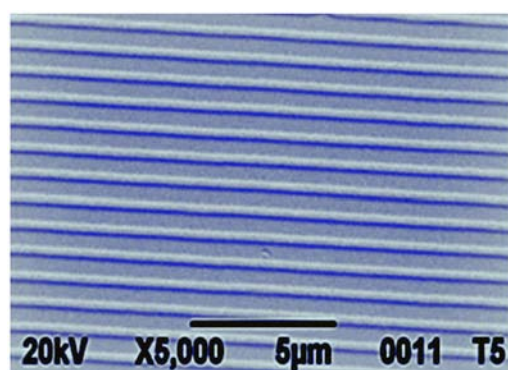


Figura 5.7: Acquisizione SAM

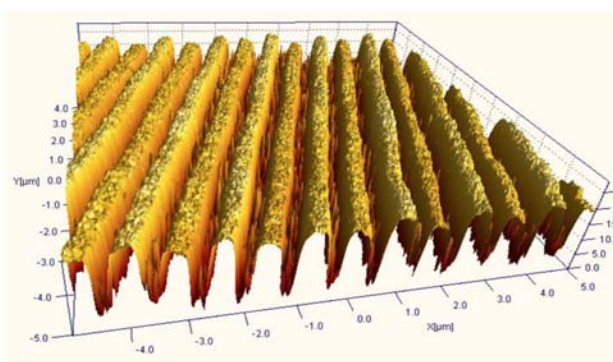


Figura 5.8: Acquisizione AFM

5.2 Preparazione e modifica dell'area attiva del sensore

L'importanza di stabilire una precisa metodologia nella realizzazione dei processi biologici è uno dei fattori più importanti al fine di ottenere misure ripetibili in cui gli errori metodologici vengano ridotti al minimo.

5.2.1 Protocollo di pulizia dei dispositivi

Per la pulizia dei nostri dispositivi vengono utilizzati:

- **MilliQ:** è un'acqua purificata e deionizzata ad un alto livello da un sistema di purificazione realizzato dalla *Millipore Corporation*. La concentrazione di ioni viene monitorata misurando la resistenza elettrica dell'acqua.
- **Etanolo:** è comunemente utilizzato come disinfettante, infatti esso uccide i microorganismi denaturandone le proteine e dissolvendo i lipidi. Risulta pertanto efficace contro batteri, funghi e virus.

La pulizia dei nostri dispositivi è stata eseguita secondo il seguente protocollo

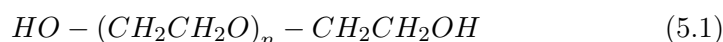
- 1 Prelevo dose di etanolo dalla soluzione madre con pipetta.
- 2 Risciacquo con etanolo per due volte la superficie metal e il substrato in polycarbonato utilizzando una dose da 1000 L per volta.
- 3 Risciacquo energicamente con acqua milliQ entrambe le facce del dispositivo.
- 4 Asciugatura rapida con flusso di azoto oppure con aria compressa in modo da evitare il formarsi di aloni con particolare attenzione alla superficie metal.

5.2.2 Protocollo di funzionalizzazione con PEG 3400 Da

I protocolli utilizzati per la funzionalizzazione dei dispositivi sono stati da me eseguiti presso i laboratori di *Veneto Nanotech*, successivamente per ogni tipologia di funzionalizzazione è stata effettuata una prova di controllo, con analogo protocollo di funzionalizzazione, effettuata dallo staff di *Veneto Nanotech*. Andremo a vedere prima i protocolli di funzionalizzazione utilizzati per le prove a concentrazione unica e in seguito quelli per prove a concentrazioni variabili.

Poly Ethylene Glycol (PEG)

Ad un primo sguardo il polimero noto come PEG (Poly Ethylene Glycol) sembra essere una semplice molecola. Si tratta di un polietere neutro lineare o ramificato, disponibile in una varietà di pesi molecolari (MWs molecular weight) diversi, è solubile in acqua e in altri solventi organici. Tra i suoi utilizzi c'è anche quello di coprire superfici per evitare ad altri polimeri, come ad esempi proteine, di legarsi alla superficie stessa. Il PEG risulta essere completamente solubile in acqua a basse temperature, mentre perde la sua solubilità a temperature elevate. Grazie ad alcuni studi [riferimento] si è visto che la polarità della catena PEG viene modificata dalla polarità del solvente. Così in solventi polari la catena assume conformazioni polari, mentre in solventi non polari sono favorite le strutture non polari. Recenti studi [riferimento] hanno mostrato come nel caso di catene brevi di PEG questa tendenza non si verifica in soluzioni acquose molto diluite, e si ha la formazione di configurazioni non polari.



Vediamo in figura 5.9 un esempio trovato in letteratura di un SAM ottenuto con PEG-tiolata in soluzione acquosa 0,2 mM.

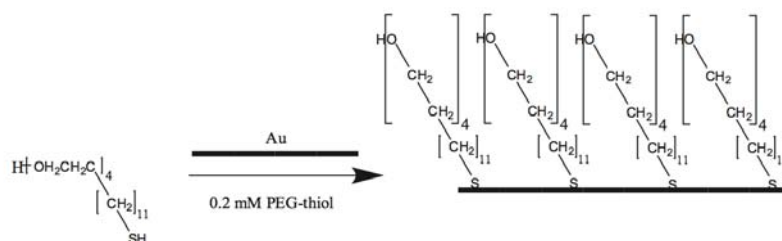


Figura 5.9: SAM costituito da PEG-tiolata

Funzionalizzazione a concentrazione unica

Per funzionalizzare in maniera indipendente i singoli spot del nostro dispositivo grating andremo ad utilizzare una maschera a 64 pozzetti (*ProPlate 64*

Well Module 246865). Secondo i protocolli normalmente utilizzati da *VenetoNanotech* sappiamo essere sufficiente un volume pari a $30 \mu L$ per coprire completamente la superficie del pozzetto e quindi ottenere una corretta funzionalizzazione degli spot. Oltre alla riga di spot funzionalizzati con PEG 3400 Da (riga gialla), andremo ad esporre una riga di spot all'acqua milliQ (riga azzurra) secondo lo schema di figura 5.11.

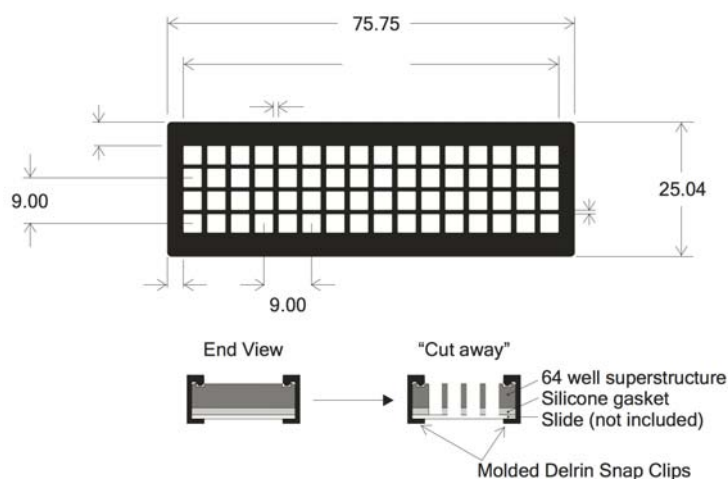


Figura 5.10: Maschera di funzionalizzazione (*ProPlate 64 Well Module 246865*)



Figura 5.11: Schema di funzionalizzazione in riferimento ai dispositivi grating utilizzati

Questo ci servirà per proteggere gli spot da eventuali interazioni con l'ambiente circostante durante il periodo utile per la funzionalizzazione ed inoltre per evidenziare quali sono gli effetti singoli dell'acqua milliQ sul dispositivo, visto che questa poi è utilizzata anche come solvente nella preparazione della soluzione di funzionalizzazione. Una volta depositati i $30 \mu L$ di soluzione o di acqua milliQ secondo lo schema di figura, lasciamo il dispositivo per un periodo di 10-12 ore (overnight) all'interno di una piastra di Petri con battuffoli di cotone imbevuti con un soluzione di NaCl 0.1M, in modo da avere un processo di funzionalizzazione a livello di umidità sufficiente. La necessità che la funzionalizzazione avvenga in ambiente umido è dovuta al fatto

che le gocce di soluzione hanno un volume ridotto e potrebbero evaporare facilmente in ambiente troppo asciutto. Procedo sigillando la petri con del parafilm, lasciando a riposo il tutto per un periodo di almeno 12 ore.

Funzionalizzazione prove in concentrazione

La modalità di esecuzione della prova e le quantità di soluzione utilizzate per la funzionalizzazione sono analoghe a quelle delle prove ad unica concentrazione. L'unica variazione è nello schema utilizzato per la funzionalizzazione. In figura in azzurro sono rappresentati i pozzetti esposti a milliQ mentre in giallo i pozzetti funzionalizzati con concentrazione C_1 mentre in arancione i pozzetti funzionalizzati alla concentrazione C_2 .



Figura 5.12: Schema di funzionalizzazione in riferimento ai dispositivi grating utilizzati

Preparazione della soluzione e diluizioni

Ricordiamo per prima cosa l'espressione della molarità:

$$M = \frac{n_{\text{soluto}}}{V_{\text{soluzione}}} = \frac{\text{moli di soluto [mol]}}{\text{volume soluzione [l]}} = \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] \quad (5.2)$$

Ora, disponendo della PEG 3400 Da in polvere, è necessaria la seguente relazione per ottenere il numero di moli presenti nella massa di quest'ultima:

$$n_{\text{soluto}} = \frac{m_{\text{soluto}}}{MM_{\text{soluto}}} = \frac{\text{massa soluto [g]}}{\text{massa molare soluto [g/mol]}} = [\text{mol}] \quad (5.3)$$

Nota la concentrazione a cui vogliamo effettuare la funzionalizzazione, il nostro obiettivo è dunque quello di calcolarci il volume di soluzione necessario per ottenere la concentrazione molare desiderata. Procediamo quindi calcolando attraverso la 5.3 il numero di moli contenute nell'aliquota di PEG a nostra disposizione, misurata con una bilancia ad alta precisione avente una sensibilità di $1 \cdot 10^{-4}g$. Una volta ottenuta il numero di moli presenti nell'aliquota di PEG 3400 Da, possiamo ricavare dalla 5.2 il volume di soluzione acquosa per ottenere la concentrazione molare desiderata:

$$V_{\text{soluzione}} = \frac{n_{\text{soluto}}}{M} = \frac{\text{moli di soluto [mol]}}{\text{concentrazione [mol/l]}} = [\text{l}] \quad (5.4)$$

Essendo nel nostro caso trascurabile il volume della polvere di PEG 3400 Da, possiamo pensare di prelevare un volume di solvente pari al volume della soluzione appena calcolato senza compiere un errore rilevante nella concentrazione molare ottenuta.

Una volta ottenuta la soluzione madre è facile procedere con le diluizioni necessarie per ottenere le diverse concentrazioni. Sarà sufficiente prelevare dalla soluzione madre i volumi necessari e poi diluirli nel solvente (nel nostro caso milliQ) secondo la seguente relazione fondamentale:

$$C_1V_1 = C_2V_2 = C_2(V_1 + \Delta V) \quad (5.5)$$

Dove C_1 è la concentrazione della soluzione di partenza, C_2 la concentrazione della soluzione diluita e V_1 e V_2 sono rispettivamente il volume prelevato e il volume ottenuto alla concentrazione C_2 . ΔV è il volume di milliQ da aggiungere al volume prelevato dalla soluzione di partenza V_1 . Sarà necessario calcolare con attenzione il volume della soluzione diluita che vogliamo ottenere in funzione del numero di pozzetti da funzionalizzare.

5.2.3 Immobilizzazione dell'anticorpo

Il processo di immobilizzazione dell'anticorpo è immediatamente consecutivo e strettamente dipendente dal processo di deposizione del SAM, nel nostro caso costituito dalla molecola PEG 3400 Da. Quindi tutti i procedimenti in seguito descritti partiranno dalla condizione di funzionalizzazione con il PEG 3400 Da vista nel paragrafo precedente. Supponiamo quindi di avere già a nostra disposizione un dispositivo funzionalizzato a concentrazione costante 1 mM secondo lo schema di figura 5.13.

L'immobilizzazione dell'anticorpo sui gruppi funzionali esposti del SAM prevede i seguenti due step:

- **Attivazione:** procediamo attivando i pozzetti contrassegnati nello schema di figura 5.14 in verde con una soluzione 5mM di *EDC* e 5mM di Sulfo-NHS, il tutto in MES buffer 1X con *pH* 6 (ricetta: 0,1 M MES (*2-[morpholino]ethanesulfonic acid*), 0,5 M NaCl, *pH* 6), sono ora necessari 15 minuti per l'attivazione dei gruppi carbossilici. Dopo questo periodo di tempo la soluzione viene rimossa, viene effettuato un rapido risciacquo in milliQ senza rimuovere la maschera di funzionalizzazione. A questo punto la superficie è pronta per la deposizione dell'anticorpo.
- **Deposizione dell'anticorpo:** negli esperimenti effettuati l'anticorpo è stato deposto ad una concentrazione pari a 1 mg/ml, in un buffer fosfato (ricetta: 0,1 M sodium phosphate, 0,3M NaCl 0,01% Triton X100 pH7,2). Una volta deposto l'anticorpo sui pozzetti attivati secondo lo schema di figura 5.14, si procede con incubazione overnight. A seguire si rimuove l'anticorpo e si risciacqua il dispositivo in milliQ e si asciuga con flusso di azoto.

Avremo quindi che nei pozzetti verdi di figura 5.14 sarà presente l'anticorpo immobilizzato al SAM mentre nei pozzetti gialli sarà presente solamente il SAM di PEG. La scelta di questo schema di funzionalizzazione ci consentirà, nelle prove sperimentali, di valutare la variazione dell'angolo di accoppiamento plasmonico, e quindi la variazione di indice di rifrazione, tra i diversi step di modifica della superficie attiva del biosensore.



Figura 5.13: Funzionalizzazione con PEG 3400 Da 1 mM nei pozzetti gialli, esposizione a milliQ nei pozzetti azzurri



Figura 5.14: In verde i pozzetti funzionalizzati con PEG 3400 Da che verranno attivati per l'immobilizzazione dell'anticorpo, in giallo i pozzetti funzionalizzati solamente con PEG 3400 Da 1 mM

Capitolo 6

Risultati Sperimentali

L'analisi dei risultati sperimentali può essere suddivisa in tre step fondamentali

- **Primo step:** analizzare le caratteristiche di ripetibilità del banco di misura descritto in precedenza. E' fondamentale determinare, prima di iniziare le misurazioni, la sensibilità della strumentazione. Successivamente andremo a valutare le caratteristiche dei dispositivi non funzionalizzati (*fresh*) che utilizzeremo.
- **Secondo step:** studiare la funzionalizzazione con molecola PEG di superfici in argento. Andremo a valutare la ripetibilità del processo funzionalizzando prima a concentrazioni costanti e poi effettuando alcune prove a concentrazione variabile.
- **Terzo step:** immobilizzazione *anticorpo policlonale di ratto anti Escherichia Coli* sul SAM costituito dalla molecola PEG precedentemente adsorbita sulla superficie.

Tutti i processi di modifica della superficie attiva del sensore sono stati eseguiti presso i laboratori di *Veneto Nanotech*.

6.1 Analisi della ripetibilità del banco di misura e dei dispositivi

6.1.1 Studio della sensibilità del banco

Uno dei parametri più importanti che vogliamo ottenere dalle prime misure è la sensibilità del banco. Andremo per prima cosa ad effettuare delle misure ripetute sullo stesso spot del dispositivo senza rimuovere o modificare l'accoppiamento ottico con l'array di fotodiodi. Successivamente andremo ad effettuare delle misure ripetute rimuovendo il dispositivo e ripristinando l'accoppiamento ottico al termine di ogni misura, riposizionandoci comunque

sullo stesso spot. Per ottenere il corretto riposizionamento del fascio laser incidente sul dispositivo applicheremo una maschera vinilica, come è possibile vedere nel dispositivo di figura 6.1. L'accoppiamento ottico, tra il substrato in policarbonato del nostro dispositivo e la finestra in resina dell'array di fotodiodi, è una delle variabili più sensibili ed importanti che influiscono sulle nostre misure. Per ottimizzare l'accoppiamento ottico è quindi necessario interporre un sottile strato d'olio d'accoppiamento tra il policarbonato e la resina che protegge l'array di fotodiodi. Purtroppo non è possibile valutare visivamente la qualità dell'accoppiamento, e l'eventuale presenza di bolle d'aria all'interfaccia, che potrebbero inficiare la trasmissione dell'onda luminosa. Sono necessarie quindi delle misure di prova per verificare il corretto accoppiamento. Una dei parametri che ci restituisce informazioni sulla qualità dell'accoppiamento è l'ampiezza dei picchi della trasmittanza. Nei dispositivi utilizzati il picco di trasmittanza misurato deve essere dell'ordine dei $80 - 100 \mu A$. Per ottimizzare la planarità tra il dispositivo e l'array di fotodiodi è stato utilizzato un layer in materiale plastico, che permette di aumentare l'area di appoggio del dispositivo stesso e di migliorare quindi l'accoppiamento ottico con l'array di fotodiodi soprattutto nella misura degli spot periferici (figura 6.1).

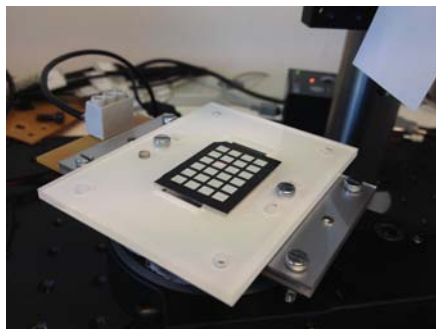


Figura 6.1: Posizionamento del dispositivo sul layer plastico

Analisi della ripetibilità delle misure

Riportiamo in seguito i parametri impostati nel software *LabView* per l'acquisizione sincronizzata tra stage rotativo e analizzatore della trasmittanza. Questo software è stato implementato in precedenza dal gruppo del laboratorio *BioDevices*. La misura con i parametri sotto indicati è stata ripetuta per 50 volte, mantenendo sempre invariata la posizione del dispositivo.

Nel grafico di figura 6.2 sono riportati gli andamenti della trasmittanza misurati nell'intervallo dell'angolo azimutale $\varphi = [-60^\circ, +60^\circ]$. Osservando i valori dei picchi di trasmittanza e l'elevata simmetria di questi possiamo dire che l'accoppiamento ottico ottenuto è soddisfacente, inoltre a livello qua-

Misure ripetute	Parametri	Valori
Acquisizione continua	Posizione di partenza	-60°
	Posizione di partenza	+60°
	Velocità angolare	1 °/s
	Incertezza sullo zero di partenza	0,05°

Tabella 6.1: Parametri utilizzati per l'impostazione del software di acquisizione LabView

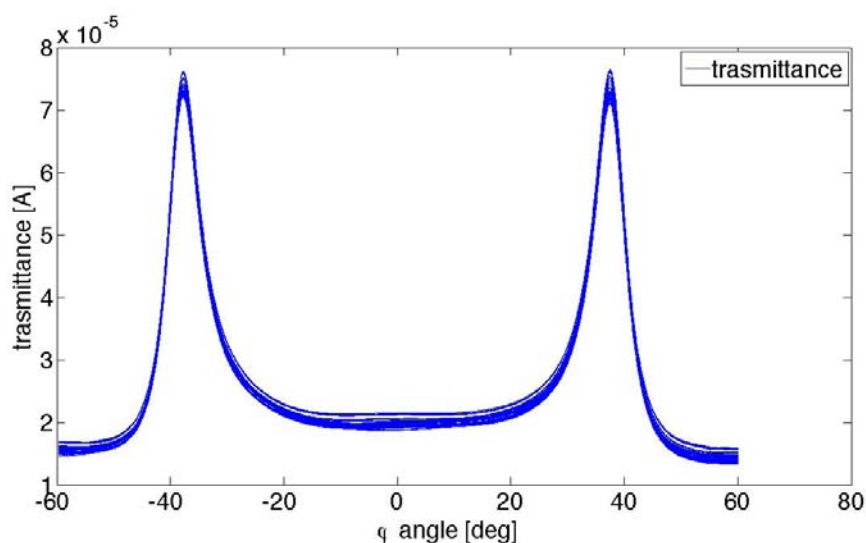


Figura 6.2: Sovrapposizione delle trasmissioni acquisite per le 50 ripetizioni nell'intervallo di angolo azimutale $[-60^\circ, +60^\circ]$

litativo possiamo dire che gli andamenti sembrano essere abbastanza ripetibili. Per un'analisi quantitativa passiamo invece alla figura 6.3 nel quale sono riportate le posizioni dell'angolo azimutale φ in corrispondenza del quale si verifica l'accoppiamento, e il valore medio (*linea verde tratteggiata*) assunto nel set di misure.

50 Misure ripetute	
φ_{fresh}	$37,62^\circ \pm 0,02^\circ$
$(\Delta \varphi_{fresh})_{MAX}$	$0,09^\circ$

Tabella 6.2: Risultati dell'analisi di ripetibilità

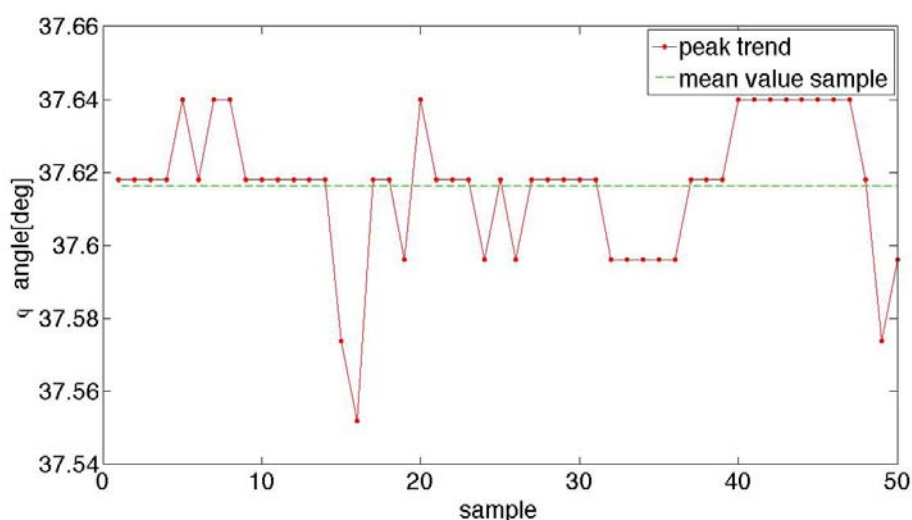


Figura 6.3: Posizione dell'angolo azimutale di SPR (*linea rossa*) e valor medio assunto nelle 50 acquisizioni (*linea verde tratteggiata*)

Analisi della riproducibilità delle misure

E' importante ora quantificare l'errore che si compie nel riposizionamento del dispositivo. Questo comprende anche l'errore dovuto alla possibile variazione della condizione di accoppiamento rispetto alle misure precedenti. Come già detto per riposizionare il fascio luminoso incidente abbiamo applicato sul dispositivo una maschera in vinile con spot quadrati di lato 3,5 mm. Riportiamo in tabella 6.3 valor medio con deviazione standard e la variazione massima tra i valori dell'angolo φ rilevati.

20 Prove di riposizionamento	
φ_{fresh}	$45,71^{\circ} \pm 0,14^{\circ}$
$(\Delta \varphi_{fresh})_{MAX}$	$0,64^{\circ}$

Tabella 6.3: Risultati dell'analisi di riproducibilità

Come potevamo dedurre, e come confermano i risultati in tabella 6.3, il procedimento di riposizionamento introduce un errore decisamente superiore rispetto a quello delle semplici misure ripetute viste nel paragrafo precedente. La massima variazione dell'angolo ($(\Delta \varphi_{fresh})_{MAX} = 0,64^{\circ}$) può essere assunta come errore delle misure che andremo ad effettuare in seguito. Esso comprende:

- Ripetibilità del banco

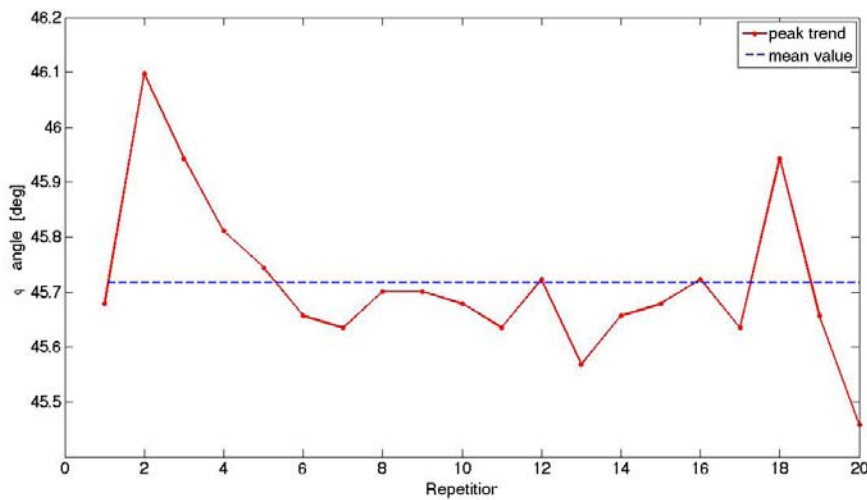


Figura 6.4: Posizione dell'angolo azimutale di SPR (*linea rossa*) e valor medio assunto nelle 20 prove di riposizionamento (*linea blu tratteggiata*)

- Riproducibilità della misura
- Variabilità dell'accoppiamento ottico

6.1.2 Caratterizzazione dei dispositivi non funzionalizzati

Questa fase, indispensabile per poi poter analizzare le modifiche apportate alla superficie attiva del sensore, si pone come obiettivo quello di caratterizzare in maniera precisa i dispositivi non funzionalizzati (fresh). Quello che ci interessa maggiormente è valutare l'uniformità delle caratteristiche tecnologiche dei nostri dispositivi, in particolare relative allo strato metallico. Infatti, come si è potuto vedere anche nelle simulazioni, una variazione dello spessore del layer metallico, ad esempio, può introdurre variazioni dell'angolo azimutale φ in corrispondenza del quale abbiamo SPR. Applichiamo sul nostro dispositivo una maschera in vinile che ci consente di suddividere il dispositivo in 24 pozzetti quadrati di lato $3,5\text{ mm}$. Riportiamo in figura 6.5 la suddivisione in colonne. Questa scelta è dovuta al fatto che si è verificato che tra spot appartenenti alla stessa colonna l'angolo φ di SPR è molto ripetibile, vediamo ora invece qual'è la variazione tra spot appartenenti a diverse colonne.

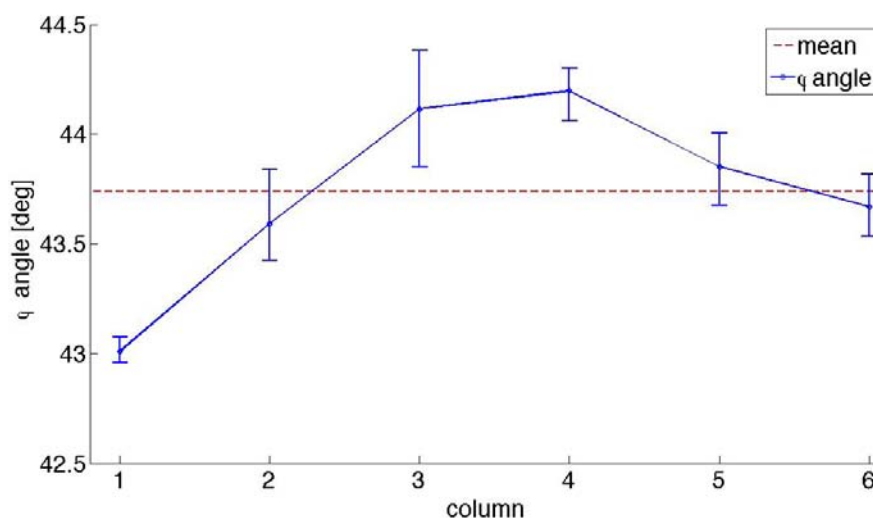
Come possiamo vedere dalla variazione rispetto al valor medio dell'angolo φ di SPR riportata in tabella 6.4 e dal grafico 6.6 l'andamento di φ assume un massimo assoluto in corrispondenza della quarta colonna e un minimo assoluto nella prima colonna. Questo andamento caratteristico come descritto in precedenza potrebbe essere dovuto alle caratteristiche del pro-



Figura 6.5: Suddivisione in colonne degli spot appartenenti al dispositivo

Colonna	1	2	3	4	5	6
φ_{fresh}	$43,01^{\circ} \pm 0,06^{\circ}$	$43,59^{\circ} \pm 0,18^{\circ}$	$44,12^{\circ} \pm 0,25^{\circ}$	$44,20^{\circ} \pm 0,10^{\circ}$	$43,85^{\circ} \pm 0,15^{\circ}$	$43,67^{\circ} \pm 0,15^{\circ}$
Variazione % dalla media	-1,66%	-0,47%	0,97%	1,06%	0,26%	-0,15%

Tabella 6.4: Media e deviazione standard degli angoli di SPR in funzione della colonna di appartenenza e variazione percentuale rispetto al valor medio

Figura 6.6: Andamento della media e della deviazione standard dell'angolo φ di SPR relativo agli spot appartenenti a diverse colonne dello stesso dispositivo

cesso produttivo. L'andamento può far presupporre uno spessore maggiore dello strato metallico in corrispondenza delle colonne centrali del dispositivo, e uno spessore minimo in corrispondenza della prima colonna. Sarà quindi necessario nelle prove successive tenere in considerazione che la variazione dell'angolo φ di SPR è trascurabile per spot appartenenti alla stessa colonna, mentre aumenta per spot appartenenti a diverse colonne, attestandosi ad un massimo di 1,66% rispetto al valore medio degli angoli misurati nello stesso dispositivo.

6.2 Studio della funzionalizzazione con molecola PEG di superfici in argento

Seguendo il protocollo presentato nel paragrafo 5.2.2 si può procedere funzionalizzando la superficie attiva del nostro dispositivo con la molecola PEG. Le prove effettuate sono state molteplici in alcune di esse si è valutato lo shift pozzetto per pozzetto misurando prima e dopo la funzionalizzazione. In altre si è considerato solamente lo shift in relazione ai pozzetti di controllo esposti a milliQ. Sono state testate le seguenti concentrazioni di funzionalizzazione:

- PEG 10 mM
- PEG 1 mM
- PEG 0,5 mM
- PEG 0,1 mM

La prova a concentrazione 10 mM si è dimostrata essere distruttiva nei confronti dello strato d'argento del dispositivo nanostrutturato. Infatti a seguito dell'esposizione overnight, come da protocollo, i pozzetti esposti a milliQ si presentano visivamente intatti, mentre quelli funzionalizzati con PEG a concentrazione 10 mM sono chiaramente danneggiati. In particolare, osservando il dispositivo al microscopio, si sono potuti vedere distacchi dello strato d'argento in alcuni pozzetti e in altri la soluzione ha eliminato totalmente lo strato d'argento (vedi figura 6.7).

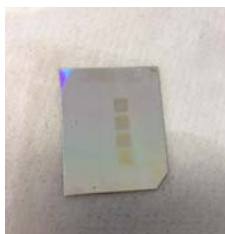


Figura 6.7: Dispositivo con strato metallico danneggiato dalla funzionalizzazione con PEG 3400 10 mM

Non è stato quindi possibile misurare la condizione di risonanza plasmonica per i pozzetti funzionalizzati con PEG 10 mM. I risultati ottenuti da questa prova hanno imposto di utilizzare concentrazioni molte più basse in modo da evitare il danneggiamento dello strato metallico.

6.2.1 Prove a concentrazione costante

L'obiettivo di queste prove è stato prima di tutto quello di validare i protocolli sperimentali descritti nei paragrafi precedenti. Successivamente, una

volta raggiunta una buona ripetibilità delle misure, si è proceduto con l'analisi dei risultati. I risultati riportati in seguito sono frutto dell'affinamento, soprattutto, delle tecniche di funzionalizzazione e dell'acquisizione di esperienza nell'utilizzare la strumentazione necessaria per funzionalizzare i dispositivi (maschera di funzionalizzazione e pipette). In tabella 6.5 sono riportati

Esperimento con misure fresh	1	2	3
φ_{fresh}	$45,38^\circ \pm 0,57^\circ$	$47,03^\circ \pm 0,17^\circ$	$46,52^\circ \pm 0,30^\circ$
$\varphi_{\text{milli-q}}$	$45,02^\circ \pm 0,42^\circ$	$45,98^\circ \pm 0,23^\circ$	$45,16^\circ \pm 0,17^\circ$
$ \varphi_{\text{fresh}} - \varphi_{\text{milli-q}} $	$1,21^\circ \pm 0,22^\circ$	$1,15^\circ \pm 0,13^\circ$	$1,24^\circ \pm 0,26^\circ$
φ_{Peg}	$40,73^\circ \pm 1,17^\circ$	$41,07^\circ \pm 0,13^\circ$	$40,95^\circ \pm 0,72^\circ$
$ \varphi_{\text{fresh}} - \varphi_{\text{Peg}} $	$4,64^\circ \pm 0,61^\circ$	$5,90^\circ \pm 0,22^\circ$	$5,70^\circ \pm 0,42^\circ$
$ \varphi_{\text{milli-q}} - \varphi_{\text{Peg}} $	$4,06^\circ \pm 1,17^\circ$	$4,91^\circ \pm 0,13^\circ$	$4,2^\circ \pm 0,72^\circ$

Tabella 6.5: Risultati medi ottenuti in tre esperimenti, dispositivo misurato sia in condizione fresh che funzionalizzata

i risultati medi, e le relative deviazioni standard, ottenuti in tre prove sperimentali di funzionalizzazione da me eseguite presso i laboratori di *Veneto Nanotech*. In queste prove abbiamo misurato i dispositivi anche prima della funzionalizzazione, questo ci consente di avere degli shift più precisi, in quanto come abbiamo visto nel paragrafo 6.1.2 l'angolo azimutale φ di SPR ha una certa variabilità anche all'interno dello stesso dispositivo. Dalla tabella 6.5 e 6.8 possiamo concludere che lo shift angolare dovuto all'esposizione alla milliQ è molto ridotto rispetto a quello introdotto dalla funzionalizzazione con PEG 3400 Da a concentrazione 1 mM . Questo è dovuto al fatto che la milliQ essendo un'acqua purissima non modifica in maniera rilevante la superficie del pozzetto se non magari inducendo un fenomeno di ossidazione o depositando alcune micro-particelle. Mentre la soluzione di PEG 3400 Da provoca la formazione di un SAM come descritto nei capitoli precedenti.

In figura 6.9 possiamo vedere a titolo esemplificativo la traslazione di uno dei due picchi simmetrici, della trasmittanza normalizzata, in funzione del trattamento apportato alla superficie.

La funzionalizzazione delle prove che andremo ad analizzare in tabella 6.6 è stata invece effettuata dallo staff di *Veneto Nanotech* senza misurare la condizione non funzionalizzata, prenderemo quindi come condizione di riferimento per lo shift angolare i pozzetti esposti a milliQ. Lo scopo di questa prova è quella di confermare i risultati ottenuti con i dispositivi da me funzionalizzati.

In figura 6.10 possiamo confrontare gli shift tra pozzetti funzionalizzati con PEG 1 mM e quelli esposti a milliQ ottenuti sia per i dispositivi funzionalizzati dopo aver misurato la condizione fresh sia per quelli in cui si è preso come controllo i pozzetti esposti a milliQ. Come possiamo vedere in figura

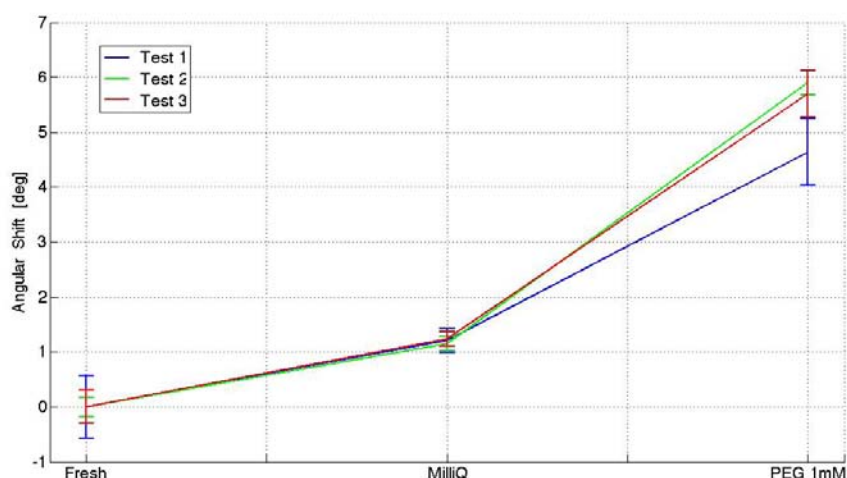


Figura 6.8: Andamento medio e deviazione standard dello shift $\Delta\varphi$ dei pozzetti esposti a milliQ e funzionalizzati con PEG 1mM rispetto alla condizione fresh

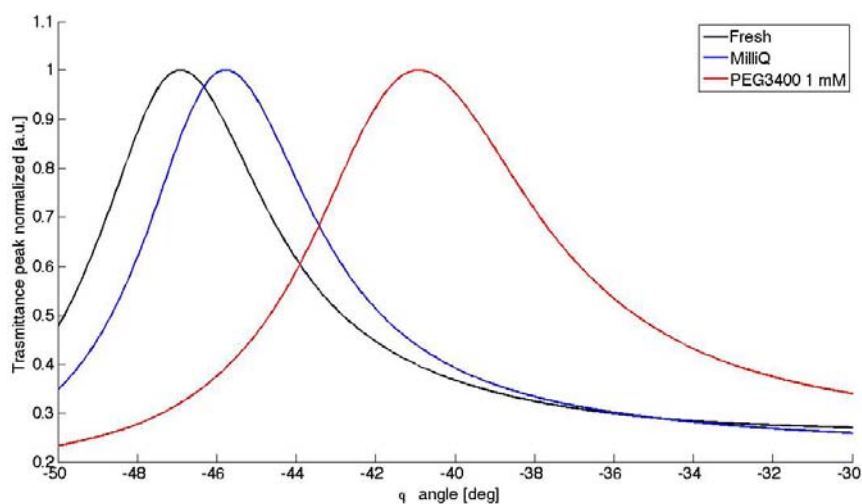


Figura 6.9: Esempio di shift della trasmittanza normalizzata al valore del picco, *linea nera*: pozzetti non funzionalizzati, *linea blu*: esposti a milliQ, *linea rossa*: funzionalizzati con PEG 1 mM

6.10 i risultati ottenuti per tutti i dispositivi sono comparabili, in quanto le barre di errore si sovrappongono per entrambe le condizioni di trattamento della superficie. Inoltre, se osserviamo le deviazioni standard relative alla media degli angoli φ di SPR nelle diverse prove, possiamo dire che queste so-

Esperimento senza misure fresh	4	5
$\varphi_{\text{milli-q}}$	$46,15^\circ \pm 0,4^\circ$	$46,02^\circ \pm 0,23^\circ$
φ_{PEG}	$40,85^\circ \pm 0,73^\circ$	$40,73^\circ \pm 0,28^\circ$
$ \varphi_{\text{milli-q}} - \varphi_{\text{PEG}} $	$5,30^\circ \pm 0,41^\circ$	$5,30^\circ \pm 0,43^\circ$

Tabella 6.6: Risultati medi ottenuti in due esperimenti, dispositivo non misurato in condizione non funzionalizzato

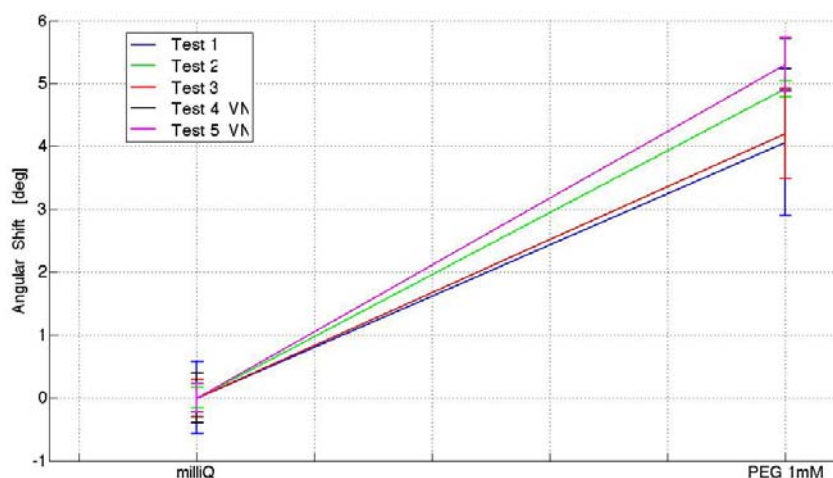


Figura 6.10: Andamento medio e deviazione standard dello shift $\Delta\varphi$ dei pozzetti funzionalizzati con PEG 1mM rispetto ai pozzetti esposti a milliQ

no sufficientemente ridotte ad eccezione dell'esperimento 1. Ricordiamo che le prove di ripetibilità riportate nel paragrafo 6.1.1 restituivano una massima variazione dell'angolo di φ di SPR, misurato su uno stesso pozzetto dopo il riposizionamento, prossima ai $0,70^\circ$. Osservando ancora le standard deviation possiamo concludere che la variabilità dei pozzetti funzionalizzati con il PEG risulta essere in genere maggiore rispetto a quella dei pozzetti misurati prima della funzionalizzazione, mentre quella dei pozzetti esposti a milliQ è in linea con questi ultimi. Le prove effettuate restituiscono uno shift per i pozzetti esposti a milliQ nell'ordine di 1° , mentre per i pozzetti funzionalizzati con PEG 1mM è compreso tra 4° e 5° .

6.2.2 Prove al variare della concentrazione

Una volta affinati i protocolli sperimentali si è provato a correlare la concentrazione della soluzione acquosa di PEG 3400 Da allo shift dell'angolo φ di SPR. Dopo le diluizioni della soluzione i protocolli per la funzionalizzazione

utilizzati sono stati analoghi a quelli della prova a concentrazione costante. A titolo esemplificativo riportiamo in figura 6.11 l'andamento della trasmittanza normalizzata in funzione del trattamento applicato alla superficie.

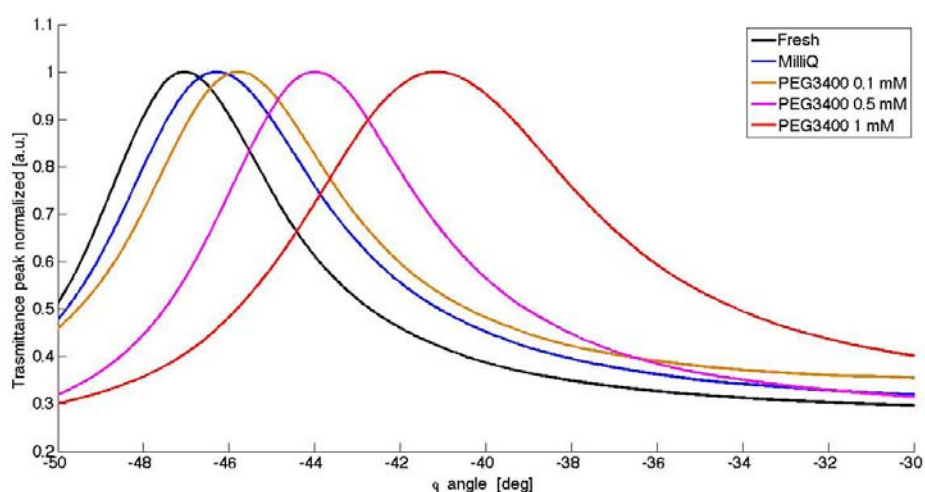


Figura 6.11: Esempio di shift della trasmittanza normalizzata al valore del picco, *linea nera*: pozzetti non funzionalizzati, *linea blu*: esposti a milliQ, *linea arancione*: funzionalizzati con PEG 0,1mM, *linea magenta*: funzionalizzati con PEG 0,5mM, *linea rossa*: funzionalizzati con PEG 1mM

In tabella 6.7 possiamo vedere una prova di funzionalizzazione da me effettuata presso i laboratori di *Veneto Nanotech* con tre concentrazioni diverse (0,1 mM 0,5 mM 1 mM). Gli shift sono stati ottenuti rispetto allo stesso insieme di pozzetti di controllo esposti a milliQ.

Esperimento 3 concentrazioni	0,1 mM	0,5 mM	1,0 mM
$\Phi_{\text{milli-q}}$		46,71°±0,15°	
Φ_{Peg}	45,65°±0,20°	43,99°±0,28°	40,86°±0,30°
$ \Phi_{\text{milli-q}} - \Phi_{\text{Peg}} $	1,99°±0,31°	2,72°±0,28°	5,19°±0,42°

Tabella 6.7: Prova a tre concentrazioni diverse

In tabella 6.8 possiamo vedere una prova effettuata dallo staff di *Veneto Nanotech* con solo due diverse concentrazioni (0,1 mM 1 mM).

Le concentrazioni che vengono testate in entrambe le prove sono la 0,1 mM e la 1 mM. In figura 6.12 mettiamo a confronto le prove a diverse concentrazioni riportate nelle tabelle 6.7 e 6.8. Come possiamo vedere in figura 6.12 le due prove sono coerenti in quanto sia per l'esposizione a milliQ e sia per le due diverse concentrazioni le barre di errore si sovrappongono. Inoltre anche

Esperimento 2 concentrazioni	0,1 mM	1,0 mM
$\varphi_{\text{milli-q}}$	46,87°±0,19°	
φ_{Peg}	45,65°±0,20°	40,86°±0,30°
$ \varphi_{\text{milli-q}} - \varphi_{\text{Peg}} $	1,50°±0,32°	5,07°±0,48°

Tabella 6.8: Prova a tre concentrazioni con funzionalizzazione effettuata presso *Veneto Nanotech*

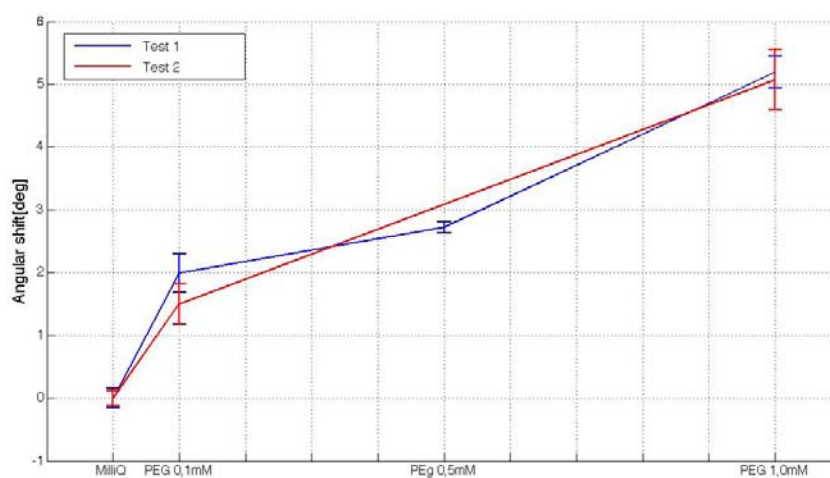


Figura 6.12: Andamento medio e deviazione standard dello shift $\Delta\varphi$ dei pozzetti funzionalizzati con PEG alle concentrazioni 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM rispetto ai pozzetti esposti a milliQ

in questo caso le deviazioni standard sono ridotte e compatibili con l'errore del banco di misura.

6.3 Studio dell'immobilizzazione dell'anticorpo

Vista la complessità del protocollo di immobilizzazione dell'anticorpo descritto al paragrafo 5.2.3, tutto il processo funzionalizzazione compresa, sono stati effettuati dallo staff di *Veneto Nanotech*. Dato che le prove a concentrazione 1 mM hanno dimostrato una buona ripetibilità si è scelto di immobilizzare l'anticorpo su un SAM di questo tipo. Anche in questo caso non disponiamo delle misure del dispositivo non funzionalizzato, utilizzeremo come controllo per i pozzetti funzionalizzati con PEG gli spot esposti a milliQ, mentre per i pozzetti in cui è immobilizzato anche l'anticorpo utilizzeremo come riferimento i pozzetti funzionalizzati con PEG ma non attivati, se-

condo lo schema di funzionalizzazione di figura 5.14. Riportiamo in figura 6.13 un esempio dell'andamento della trasmittanza normalizzata in funzione della condizione dei pozzetti. A livello qualitativo possiamo già dire che lo shift introdotto dal SAM risulta essere maggiore rispetto a quello introdotto dall'immobilizzazione dell'anticorpo.

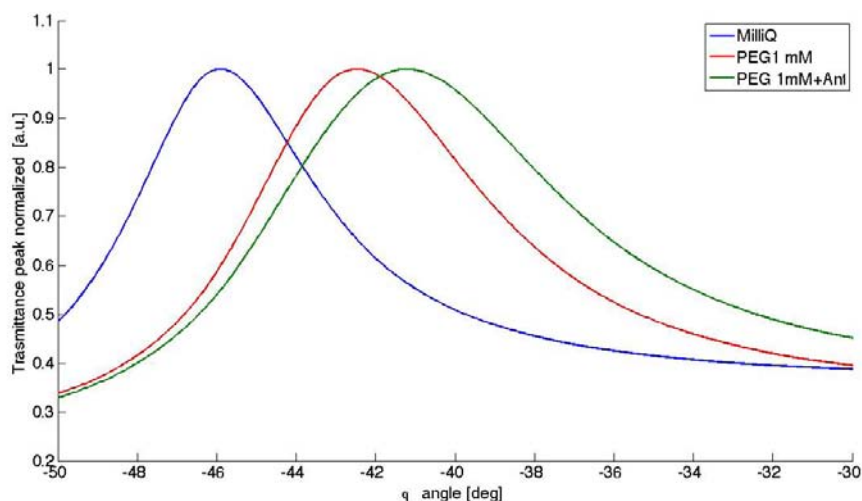


Figura 6.13: Esempio di shift della trasmittanza normalizzata al valore del picco, *linea blu*: esposti a milliQ, *linea rossa*: funzionalizzati con PEG 1mM, *linea verde*: anticorpo immobilizzato

Esperimento PEG+Anticorpo (Veneto Nanotech)	1	2	3
$\Phi_{\text{milli-q}}$	46,96°±0,28°	45,78°±0,17	45,01°±0,17°
Φ_{Peg}	42,61°±0,19°	42,20°±0,26	40,18°±0,31°
$\Phi_{\text{Peg+Ant.}}$	41,01°±0,86°	39,53°±0,56°	39,27°±0,63°
$ \Phi_{\text{milli-q}} - \Phi_{\text{Peg}} $	4,35°±0,19°	3,53°±0,31°	4,87°±0,27°
$ \Phi_{\text{Peg}} - \Phi_{\text{Peg+Ant.}} $	1,60°±0,86°	2,68°±0,56°	0,90°±0,63°

Tabella 6.9: Prova di funzionalizzazione con immobilizzazione dell'anticorpo

Dalla tabella 6.9 e dalla figura 6.14 notiamo che lo shift introdotto dall'anticorpo rispetto alla condizione di sola funzionalizzazione con PEG 1 mM è compreso tra 0,90° e 2,69°. Osservando anche la deviazione standard delle misure relative ai pozzetti nei quali è immobilizzato l'anticorpo possiamo dire che la variabilità risulta essere molto più elevata rispetto a quella dei pozzetti funzionalizzati solamente con PEG. Questo ci fa dedurre che il processo di immobilizzazione ha una variabilità intrinseca maggiore, sarà quindi necessario in futuro ottimizzare i protocolli di immobilizzazione al fine di

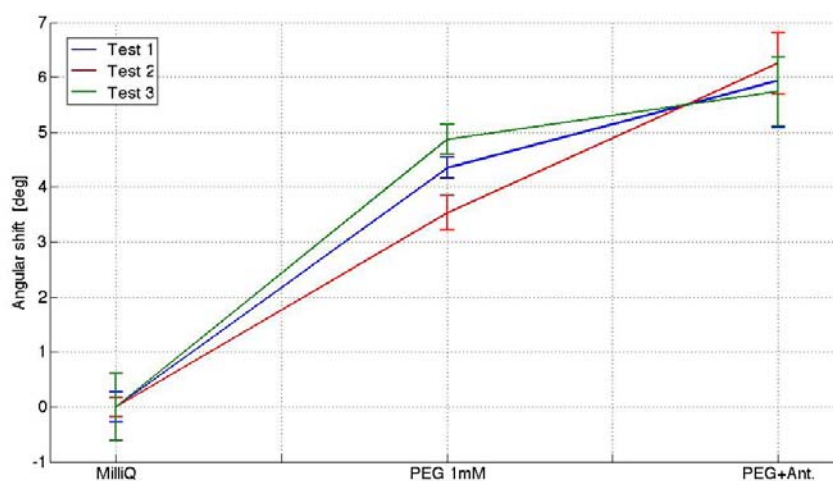


Figura 6.14: Andamento medio e deviazione standard dello shift $\Delta\varphi$ dei pozzetti funzionalizzati con PEG 1 mM e di quelli con anticorpo immobilizzato rispetto ai pozzetti esposti a milliQ

ottenere una maggiore ripetibilità del processo. Essendo state effettuate per la prima volta le prove sono comunque soddisfacenti, in quanto è comunque al momento rilevabile uno shift tra la condizione PEG e la condizione PEG con anticorpo immobilizzato.

6.3.1 Calcolo della sensibilità dell'indice di rifrazione

Proviamo ora a calcolare la sensibilità dell'indice di rifrazione tra le due diverse condizioni della superficie del nostro dispositivo con il metodo illustrato nel paragrafo 4.3. Utilizzeremo le misure relative alla prova 2 nella quale lo shift tra la condizione PEG e PEG+Anticorpo è maggiore. In figura possiamo vedere le tre condizioni del dispositivo da valutare per poter calcolare l'indice di rifrazione effettivo η_{eff} . Ricordiamo la formulazione di η_{eff} nel

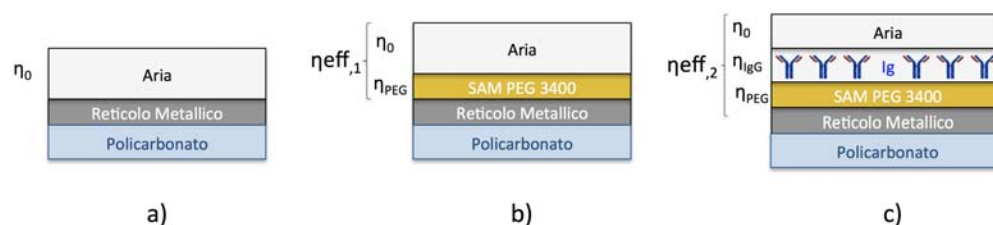


Figura 6.15: a) *Dispositivo non funzionalizzato* b) *Dispositivo funzionalizzato con PEG 0,1 mM* c) *Dispositivo funzionalizzato con PEG 0,1 mM e con Ig*

caso di approssimazione di:

- Due mezzi dielettrici con diverso indice di rifrazione η (Figura 6.15 b))

$$\eta_{eff,1} = \eta_{PEG} \left[1 - e^{-2\frac{d_{PEG}}{L}} \right] + \eta_0 e^{-2\frac{d_{PEG}}{L}} \quad (6.1)$$

- Tre mezzi dielettrici con diverso indice di rifrazione η (Figura 6.15 c))

$$\eta_{eff,2} = \eta_{PEG} \left[1 - e^{-\frac{2d_{PEG}}{L}} \right] + \eta_{Ig} \left[e^{-\frac{2d_{PEG}}{L}} - e^{-\frac{2(d_{Ig}+d_{PEG})}{L}} \right] + \eta_0 e^{-\frac{2(d_{Ig}+d_{PEG})}{L}} \quad (6.2)$$

Parametri noti dalla letteratura:

- $\eta_0 = 1$ indice di rifrazione dell'aria
- $\eta_{PEG} = 1,5$ indice di rifrazione del PEG
- $\eta_{Ig} = 1,45$ indice di rifrazione dell'anticorpo
- $d_{PEG} = 5 \text{ nm}$ dimensione verticale molecola PEG
- $d_{Ig} = 5 \text{ nm}$ dimensione verticale anticorpo
- Estensione spaziale dei plasmoni $L = 196 \text{ nm}$

Una volta ottenuto l'indice di rifrazione effettivo della condizione della superficie in osservazione possiamo procedere con il calcolo del $\Delta\eta_{eff}$ rispetto alla condizione di riferimento e quindi ricavarci la sensibilità dell'indice di rifrazione con la seguente formulazione:

$$S_{RI} = \frac{\Delta\varphi}{\Delta\eta_{eff}} \quad (6.3)$$

Riportiamo in tabella i risultati ottenuti dalla prova sperimentale 2.

$\Delta\varphi = \varphi_{\text{milliQ}} - \varphi_{\text{PEG}}$	3,53°	$\Delta\varphi = \varphi_{\text{milliQ}} - \varphi_{\text{PEG+Ant}}$	6,21°
$\Delta\eta = \eta_0 - \eta_{\text{eff},1}$	0,025 RIU	$\Delta\eta_2 = \eta_0 - \eta_{\text{eff},2}$	0,045 RIU
$S_{RI,1}$	141,2 deg/RIU	$S_{RI,2}$	138 deg/RIU

Tabella 6.10: Sensibilità dell'indice di rifrazione

I valori di sensibilità dell'indice di rifrazione sono prossimi ai risultati presenti in letteratura. E' necessario comunque tener conto che i parametri definiti per il calcolo dell'indice di rifrazione effettivo (d e η_{eff}) sono delle approssimazioni sensibili a molti parametri specifici delle condizioni in cui viene effettuata la funzionalizzazione. Possiamo quindi ritenere soddisfacenti le misure effettuate con il nostro sistema sperimentale.

Capitolo 7

Conclusioni

Il lavoro sviluppato in questa Tesi costituisce le basi per la validazione di un biosensore basato sul fenomeno di risonanza plasmonica superficiale (SPR) in grado di riconoscere la contaminazione batterica in campioni, utilizzando una tecnica di trasduzione optoelettronica dei raggi trasmessi diffratti da dispositivi con reticoli nanostrutturati.

Preliminarmente si sono determinate le caratteristiche optoelettroniche dei dispositivi nanostrutturati forniti dallo spin-off dell'Università di Padova *Next Step Engineering*.

La caratterizzazione dei dispositivi funzionalizzati con PEG 3400 Da ha restituito risultati rilevabili dal banco di misura con elevata ripetibilità per le tre concentrazioni testate ($0,1\text{ mM}$, $0,5\text{ mM}$, $1,0\text{ mM}$). L'immobilizzazione degli anticorpi policlonali di ratto anti-Escherichia Coli è stata testata con risultati soddisfacenti in termini di rilevazione da parte del banco ottico. I risultati sperimentali ottenuti per i primi due step di modifiche alla superficie attiva del sensore rispecchiano quanto ipotizzato dalle simulazioni ottenute con il metodo *Rigorous Coupled Wave Analysis (RCWA)*. Inoltre la sensibilità dei dispositivi risulta essere in linea con i valori descritti in letteratura.

Lo sviluppo immediato dell'attività descritta nella mia Tesi sarà la verifica che gli anticorpi immobilizzati sulla superficie del sensore SPR catturino con adeguata selettività i batteri bersaglio presenti in matrici complesse, quali ad esempio il vino, e che questa condizione sia rilevabile dal sistema di trasduzione optoelettronica dell'indice di rifrazione.

Ringraziamenti:

Si ringraziano per la collaborazione lo staff di *Veneto Nanotech* e di *NextStep Engineering*.

Bibliografia

- [1] Stefan A. Maier (2007). Plasmonics fundamentals and application, Springer, New York, NY.
- [2] Jackson, John D. (1999). Classical Electrodynamics. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 3rd edition.
- [3] Marder, Michael P. (2000). Condensed Matter Physics. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- [4] Boyd, Robert W. (2003). Nonlinear Optics. Academic Press, San Diego, CA, second edition.
- [5] Ashcroft, Neil W. and Mermin, N. David (1976). Solid state physics. Saunders College Publishing, Orlando, FL, first edition.
- [6] Drude, Paul (1900). Zur Elektronentheorie der Metalle. Ann. Phys., 1:566–613.
- [7] Kretschmann, E. and Raether, H. (1968). Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. Z. Naturforschung, 23A:2135–2136.
- [8] Otto, A. (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. Z. Physik, 216:398–410.
- [9] J. Homola-Surface Plasmon Resonance Based Sensors (Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Volume 4) (2006)
- [10] Grigorenko AN, Nikitin PI, Kabashin AV (1999) Appl Phys Lett 75:3917
- [11] Hutley MC (1982) Diffraction gratings. Academic, London
- [12] Moharam MG, Gaylord TK (1986) J Opt Soc Am A 3:1780
- [13] Li LF (1993) J Opt Soc Am A 10:2581
- [14] Homola J (2003) Anal Bioanal Chem 377:528

- [15] Matsubara K, Kawata S, Minami S (1988) *Appl Spect* 42:1375
- [16] Zhang LM, Uttamchandani D (1988) *Electron Lett* 24:1469
- [17] Nylander C, Liedberg B, Lind T (1982) *Sensor Actuator* 3:79
- [18] Brockman JM, Nelson BP, Corn RM (2000) *Ann Rev Phys Chem* 51:41
- [19] Kruchinin AA, Vlasov YG (1996) *Sensor Actuator B Chem* 30:77
- [20] Ho C, Robinson A, Miller D, Davis M (2005) *Sensors* 5:4
- [21] Tumolo T, Angnes L, Baptista MS (2004) *Anal Biochem* 333:273
- [22] de Feijter JA, Benjamins J, Veer FA (1978) *Biopolymers* 17:1759
- [23] Thomsen V, Schatzlein D, Mercurio D (2003) *Spectroscopy* 18:112
- [24] Drake AW (1967) *Fundamentals of applied probability theory*. McGraw-Hill, New York
- [25] Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology J. Christopher Love,[†], Lara A. Estroff,[†], Jennah K. Kriebel,[†], Ralph G. Nuzzo,^{*,‡} and, and George M. Whitesides^{*,†} *Chemical Reviews* 2005 105 (4), 1103-1170
- [26] Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK (1992) *Immobilized affinity ligand techniques*. Academic, New York
- [27] Johnsson B, Lofas S, Lindquist G (1991) *Anal Biochem* 198:268
- [28] Lofas S, Johnsson B, Tegendal K, Ronnberg I (1993) *Colloids Surf B: Biointerfaces* 1:83
- [29] Sprik M, Delamarche E, Michel B, Rothlisberger U, Klein ML, Wolf H, Ringsdorf H (1994) *Langmuir* 10:4116
- [30] M. Moharam, D. Pommet, E. Grann, and T. Gaylord, Stable implementation of the rigorous coupled-wave analysis for surface-relief gratings: enhanced transmittance matrix approach, *J. Opt. Soc. Am. A* 12, 1077-1086 (1995)
- [31] M. G. Moharam, E. B. Grann, D. A. Pommet, and T. K. Gaylord, "Formulation for stable and efficient implementation of the rigorous coupled-wave analysis of binary gratings," *J. Opt. Soc. Am. A* 12, (1995).
- [32] Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films Linda S. Jung,[†], Charles T. Campbell,^{*,†}, Timothy M. Chinowsky,[‡], Mimi N. Mar,[‡] and, and Sinclair S. Yee[‡] *Langmuir* 1998 14 (19), 5636-5648

- [33] F. Romanato, K. Lee, H. Kang, G. Ruffato, and C. Wong, Sensitivity enhancement in grating coupled surface plasmon resonance by azimuthal control, *Opt. Express* 17, 12145-12154 (2009).
- [34] . Qi, Y. Li, and J. Zhong, Optimized angle scanning method for array sample detection in surface plasmon resonance biosensor, *Appl. Opt.* 51, 1245-1250 (2012).